



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> C12N 15/82, 5/10, A01H 5/00 C02N 15/40	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> WO 91/13159 <b>(43) Date de publication internationale:</b> 5 septembre 1991 (05.09.91)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR91/00170 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 1er mars 1991 (01.03.91)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 90/02686                      2 mars 1990 (02.03.90)                      FR 90/02687                      2 mars 1990 (02.03.90)                      FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIOSEM [FR/FR]; B.P. 1, Chappes, F-63720 Ennezat (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> GERENTES, Denise [FR/FR]; 1, rue de la République, F-63170 Aubière (FR). PEREZ, Pascual [FR/FR]; 36, rue des Noyers, F- 63110 BEAUMONT (FR). KALLERHOFF, Jean [FR/ FR]; 56 bis, boulevard Gambetta, F-63400 Chamalières (FR). BEN TAHAR, Sophie [FR/FR]; 26, rue Verne- mouze, F-63000 Clermont-Ferrand (FR). PERRET, Joël [FR/FR]; 26, chemin de Giroux, OPME, F-63540 Roma- gnat (FR).		<b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann Yves Plasseraud S.A., 67, boulevard Haussmann, F- 75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), BG, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), RO, SE (brevet européen), SU, US.  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée          dès réception de ce rapport.</i>

**(54) Title:** REGENERATION AND GENETIC TRANSFORMATION OF SUGAR BEET

**(54) Titre:** TRANSFORMATION GENETIQUE ET REGENERATION DE LA BETTERAVE SUCRIERE

**(57) Abstract**

A method for transforming plant cells of the species *Beta vulgaris*, wherein a dispersion or a suspension of crumbly white calluses is contacted with *Agrobacterium* containing a vector carrying a gene intended for insertion into the plant cells, followed by the coculture of the plant cells and the bacteria to produce transformed crumbly calluses, which are then regenerated into transgenic plants. Transgenic plants are also described which belong to the species *Beta vulgaris* and are resistant to infection by the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), said plants being stably transformed by a nucleic acid fragment which codes for at least a part of the capsid protein of BNYVV or for a derivative thereof.

**(57) Abrégé**

L'invention concerne un procédé de transformation de cellules végétales appartenant à l'espèce *Beta vulgaris* caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'une dispersion de cals blancs friables, ou d'une suspension de cals blancs friables avec *Agrobacterium* contenant un vecteur portant un gène destiné à être introduit dans les cellules végétales, suivie de coculture des cellules végétales et des bactéries pour donner lieu à des cals friables transformés. Les cals transformés sont ensuite régénérés en plantes transgéniques. L'invention concerne également des plantes transgéniques appartenant à l'espèce *Beta vulgaris* et résistantes à l'infection par le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave à sucre (BNYVV), lesdites plantes étant transformées d'une manière stable par un fragment d'acide nucléique, ledit fragment codant pour au moins une partie de la protéine de capsid du BNYVV ou pour un dérivé de cette protéine.



**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				



TRANSFORMATION GENETIQUE ET REGENERATIONDE LA BETTERAVE SUCRIERE

L'invention concerne un procédé de transformation génétique de cellules végétales appartenant à l'espèce Beta vulgaris, suivie éventuellement par une étape de régénération de cellules transformées en plante entière.

L'invention concerne également les cellules transformées, les bourgeons, les plantes et les graines transgéniques susceptibles d'être produits par ce procédé.

L'invention concerne en outre, des plantes transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris, résistantes à l'infection par le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave à sucre (BNYVV), exprimant la protéine de capsid du BNYVV, ou un dérivé de cette protéine.

Les références bibliographiques apparaissant dans la description de l'invention sont répertoriées sous forme de bibliographie.

L'obtention de plantes transgéniques met en oeuvre le transfert du fragment d'ADN sélectionné dans la cellule végétale, la sélection des cellules transformées de façon stable et la régénération de plantes entières à partir des cellules sélectionnées transformées.

Le problème technique qui s'est posé lors de l'élaboration de la présente invention était de trouver une méthode de transformation de cellules de betterave présentant une fréquence de transformation élevée qui pouvait être associée avec succès à une méthode de régénération de plante transgénique. A ce jour, une telle méthode de transformation et de régénération n'a pas été décrite, empêchant la production de betteraves transgéniques présentant des



caractéristiques agronomiquement intéressantes, telle que la résistance à la rhizomanie.

Actuellement, il existe deux grandes voies de transfert d'ADN dans les cellules végétales.

La première voie est une voie physico-chimique (électroporation, microinjection, polycations, canon à particules). Chez la betterave, des cellules transformées de manière stable ont été sélectionnées après électroporation d'un gène codant pour la résistance à la kanamycine dans les protoplastes (Lindsey et al, 1989).

Cependant, ce procédé n'a jamais pu conduire à la création de betteraves transgéniques puisque la régénération de plantes à partir de protoplastes n'a pu être obtenue chez cette espèce.

La deuxième voie de transfert d'ADN est une voie biologique utilisant comme vecteur une bactérie du sol : Agrobacterium tumefaciens ou rhizogenes.

Différentes souches de ces deux espèces ont été utilisées avec succès pour la transformation de cellules de betteraves. Ces cellules transformées ont donné naissance soit à des tumeurs avec Agrobacterium tumefaciens (Krens et al, 1988) soit à des racines avec Agrobacterium rhizogenes (Yacoub et al, 1987). Ces tissus transformés (racines et tumeurs) n'ont jamais permis à ce jour la régénération de plantes chez la betterave. Ceci vient du fait que ces deux phénotypes sont les résultats de l'intégration dans le génome de la cellule non seulement du fragment d'ADN désiré mais aussi d'un fragment d'ADN de la bactérie qui perturbe l'équilibre hormonal de la cellule (Akiyoshi et al, 1983). Pour pallier ces problèmes, ces gènes ont été délétés, donnant de nouvelles souches d'Agrobacterium dites souches désarmées.





L'utilisation des souches d'Agrobacterium désarmées implique l'association d'un système sélectif pour la transformation de cellules végétales. Le succès dans l'obtention de transformants est étroitement lié à la mise au point d'un bon système sélectif. Le gène sélectif le plus utilisé dans ce domaine est celui provenant du transposon Tn5 d'Escherichia coli (Rothstein et al, 1981) codant pour la néomycine phosphotransférase (NPT II) qui confère la résistance à la kanamycine (An et al, 1985).

La plupart des vecteurs plasmidiques utilisés dans ces souches désarmées contiennent dans l'ADN transférable, outre le gène désiré, le gène NPT II, sous le contrôle de signaux de transcription végétaux (Bevan, 1984 ; An, 1986). Le système de sélection comprend d'une part le gène conférant la résistance, et d'autre part, l'agent sélectif. Ceci implique de déterminer les concentrations d'agent sélectif permettant à la fois de tuer les cellules non transformées et de laisser croître les cellules transformées. Les seuls travaux publiés concernant la sélection de cellules de betterave après transformation d'explants pluricellulaires par Agrobacterium font appel à un autre système sélectif : hygromycine B / hygromycine B phosphotransférase (Harpster et al, 1988).

La transformation par Agrobacterium nécessite dans un premier temps le choix d'un type de cellule ou d'un type d'explant qui va faire l'objet de la transformation. Par exemple, des explants tels que des hypocotyles, des morceaux de feuilles (Krens et al, 1988) peuvent être transformés par Agrobacterium.

La fréquence de transformation peut varier selon le type de cellule ayant fait l'objet de la



transformation, cette variabilité étant souvent d'une nature imprévisible.

Lors de la production d'une plante transgénique, la transformation est suivie par un procédé de régénération.

L'efficacité d'obtention des plantes transgéniques dépend de la fréquence de régénération de plantes à partir de cellules transformées d'une part, et la fréquence de transformation des cellules d'autre part.

Par exemple, la transformation de tronçons de pétioles de betterave a donné des cals transformés sélectionnés sur kanamycine. Cependant, il n'a jamais été possible de régénérer des plantes à partir de ces cals transformés issus de pétioles, bien que la régénération d'embryons somatiques et de bourgeons à partir de ce type de cal dans l'état non-transformé ait été reportée (Tetu et al, 1987). Cet échec n'est pas surprenant si on prend en compte la faible fréquence de régénération décrite.

Ceci traduit bien les problèmes de régénération, à partir d'explants, de plantes non-transformées, rencontrés depuis longtemps chez la betterave sucrière (Ritchie et al, 1989). Plusieurs auteurs ont décrit la régénération directe de bourgeons adventifs à partir de fragments de pétioles de plantes en multiplication végétative (Detrez et al, 1988 ; Freytag et al, 1988). Bien que ce phénomène se soit avéré reproductible dans des conditions appliquées par les inventeurs, la fréquence s'est révélée beaucoup trop faible pour être associée à la transformation. D'autre part, il semble que ces néoformations proviennent de massifs cellulaires non accessibles à la bactérie et apparemment peu sensibles à un agent sélectif.



Une autre technique de régénération de plantes non transformées à partir de cellules de betteraves à sucre est celle décrite par Saunders et al (1986). Elle met en jeu dans un premier temps, l'induction de cals friables indépendants d'hormones et initiés probablement à partir des cellules épidermiques du limbe, puis dans un deuxième temps, la régénération de bourgeons et d'embryons somatiques à partir de ces cals. Cette technique a été facilement reproductible sur plusieurs variétés de betteraves sucrières. Un des intérêts de ce processus est la possibilité d'obtenir aisément des suspensions cellulaires à partir de cals friables dont le potentiel organogène peut être entretenu pendant quelques mois.

Les inventeurs ont découvert que ce matériel organogène, c'est-à-dire les cals friables, peut être utilisé, dans des conditions précises, pour la transformation par Agrobacterium tumefaciens.

Il y a encore peu de temps la transformation de suspensions cellulaires ne paraissait pas concevable selon le dogme établi que le transfert d'ADN par Agrobacterium dans une cellule végétale nécessitait des lésions cellulaires. Cependant, des auteurs ont reporté la transformation de cellules en suspension chez le tabac et la carotte (AN, 1985 ; Scott et Draper, 1987). A ce jour, la transformation de cellules en suspension chez la betterave n'a pas été décrite. Par ailleurs, il est à noter que les méthodes de transformation qui s'appliquent avec succès à une espèce végétale ne peuvent pas être étendues systématiquement à d'autres espèces. Les conditions de transformation, les matériels de départ et les milieux de culture sont des paramètres variables spécifiques à chaque espèce.



En ce qui concerne la transformation et la régénération de betteraves transgéniques résistantes à la rhizomanie, tout progrès a été empêché, par le manque d'un procédé de production fiable.

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave à sucre (BNYVV) est un virus à composants multiples, constitué de particules virales à symétrie hélicoïdale, contenant quatre types de RNA simple brin, de polarité positive (Putz, 1987). Ce virus est disséminé par un champignon du sol, Polymixa betae, qui parasite les cellules superficielles des racinelles de chénopodiacées, dont fait partie la betterave à sucre. Cette chénopodiacée bisannuelle reste à l'état de rosette la première année en donnant une racine charnue et sucrée, et monte à graine la deuxième année après vernalisation. La persistance de la maladie dans le sol est due aux kystes formés par le champignon (Tamada, Baba, 1973).

Il est connu que le virus se développe essentiellement dans la partie racinaire (pivot et racines secondaires). Le symptôme principal de la maladie consiste en une prolifération du chevelu racinaire (d'où le nom de rhizomanie). Mais le nom du virus provient en fait de symptômes plus tardifs visibles dans la partie végétative à savoir : nécroses et jaunissement des nervures dus au fait que le virus se développe surtout au niveau des vaisseaux racinaires, en perturbant ainsi le métabolisme de toute la plante (Sallé et al, 1986).

Plusieurs auteurs ont reporté que le virus n'est détecté dans la partie aérienne que très rarement alors qu'il est présent en grande quantité au niveau des racines et du pivot (Putz, 1977 ; Ziegler et al, 1985).





Le contrôle des maladies virales des végétaux reste problématique, malgré l'avènement du génie génétique végétal.

Abel et al (1986) ont introduit un gène codant pour la protéine de capsid du virus de la mosaïque du tabac (VMT) dans le génome des plantes naturellement sensibles à ce virus. Cette manipulation génétique a provoqué un retard du développement de la maladie chez les plantes transgéniques. D'autres réalisations du même type ont été reportées avec d'autres virus ;

- Alfalfa Mosaic Virus, et Tobacco Rattle Virus, sur tabac (Van Dun et al, 1987),
- Alfalfa Mosaic Virus sur tabac (Loesch Fries et al, 1987),
- Alfalfa Mosaic Virus sur tabac et tomate (Tumer et al, 1987).

Deux équipes ont créé des plantes transgéniques exprimant des gènes codant pour des ARN antisens, complémentaires de l'ARN codant pour la protéine de capsid, et ils montrent que la résistance est beaucoup moins importante que celle conférée par la protéine de capsid (Cuozzo et al, 1988 ; Hemenway et al, 1988).

Enfin, d'autres laboratoires ont créé des plantes transgéniques exprimant des gènes codant pour des ARN satellites. Cette stratégie a été adoptée par Gerlach et al (1987) pour le virus des tâches annulaires du tabac, et par Harrison et al (1987) pour le virus de la mosaïque du concombre (CMV).

Aucun satellite n'étant connu pour le BNYVV, les inventeurs ont envisagé de faire produire aux cellules végétales transformées soit des ARN antisens, soit des ARN sens codant pour des protéines virales normales, mutées ou délétées, susceptibles d'inhiber le développement du virus.



Le procédé de transformation de l'invention implique :

- la transformation de suspensions cellulaires habituées, donnant des cals et suspensions cellulaires transformés ;

- la transformation de suspensions cellulaires régénérantes donnant des cals, des suspensions cellulaires et des plantes transformés ;

- la transformation de cals friables en dispersion donnant des cals, des suspensions cellulaires et des plantes transformés.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé de transformation de cellules végétales appartenant à l'espèce Beta vulgaris caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'une dispersion de cals blancs friables dans un milieu de culture cellulaire végétale liquide contenant 0 à environ 3.0 mgL<sup>-1</sup> d'une cytokine, ou d'une suspension de cals blancs friables dans un milieu de culture cellulaire végétale liquide contenant environ 0.1 à environ 3.0 mgL<sup>-1</sup> d'une cytokinine, avec Agrobacterium contenant un vecteur portant un gène destiné à être introduit dans les cellules végétales, suivie de coculture des cellules végétales et des bactéries pour donner lieu à des cals friables transformés. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, ce procédé de transformation comprend les étapes successives suivantes :

I) induction de cals blancs friables à partir d'explant ;

II) dispersion des cals dans un milieu de culture cellulaire végétale liquide contenant 0 à environ 3.0 mgL<sup>-1</sup> d'une cytokinine, ou obtention d'une suspension cellulaire à partir des cals dans un milieu



de culture cellulaire végétale liquide contenant environ 0.1 à environ 3.0  $\text{mg l}^{-1}$  d'une cytokinine ;

III) mise en contact de la dispersion, ou de la suspension, avec Agrobacterium tumefaciens contenant un vecteur portant un gène destiné à être introduit dans les cellules végétales, suivie de coculture des cellules végétales et des bactéries ;

IV) lavage des cellules végétales pour éliminer les bactéries et sélection des cellules transformées sur un milieu sélectif ;

V) culture des cellules transformées sélectionnées pour obtenir des cals friables transformés.

La première étape de la transformation est l'induction de cals blancs friables à partir d'explants de betterave. Les explants qui peuvent servir dans cette étape peuvent être par exemple des disques de feuilles, des tronçons de pétioles, etc. De préférence, les explants sont des morceaux de jeunes feuilles prélevées d'une plante âgée de moins de trois mois.

Par exemple, après germination de graines de betterave d'environ un mois, de jeunes feuilles de 3 à 5 cm de long sont prélevées de chaque plante et sont soumises à une étape de désinfection et rinçage. Chaque feuille est ensuite découpée en petits morceaux de 0,25  $\text{cm}^2$  à 1.0  $\text{cm}^2$ . Les feuilles peuvent être prélevées de la plante jusqu'à deux mois environ après les premiers prélèvements. Après cette période, l'aptitude de régénération des feuilles diminue. Les disques de feuilles sont ensuite mis en culture sur un milieu de culture cellulaire végétale contenant de 0,1 à 5,0  $\text{mg l}^{-1}$  cytokinine. De préférence, la cytokinine est présente à raison d'environ 1.0  $\text{mg l}^{-1}$  et peut être, par exemple, la 6-benzylaminopurine (BAP), la zéatine,



ou la kinétine. La BAP est particulièrement préférée. Le milieu de culture cellulaire végétale est avantageusement le milieu de Murashige et Skoog (1962), dit milieu M.S. Les explants sont cultivés à 30°C environ pendant 30 jours dans l'obscurité, et ensuite ils sont sortis en chambre de culture avec une photopériode de 18/24 H par exemple à environ 25°C le jour et 20°C la nuit.

De 4 à 10 semaines après la mise en culture, des cals blancs friables apparaissent autour, sur ou sous les explants foliaires.

L'étape suivante du procédé de transformation est la production d'une suspension cellulaire à partir des cals, ou d'une dispersion des cals dans un milieu de culture liquide. Cette suspension ou dispersion sera utilisée ultérieurement pour la transformation.

La suspension cellulaire est obtenue par mise en culture des cals, 4 à 6 semaines après leur apparition dans un milieu de culture liquide additionné de 0,1 à 3,0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> d'une cytokinine, par exemple de la BAP. Cette étape de culture dure 2 à 3 semaines et est effectuée sous agitation. Le milieu de culture est avantageusement le milieu M.S. Un milieu particulièrement préféré est le milieu M.S additionné de 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP. Ce milieu sera appelé le milieu MSB1 dans ce qui suit. Sa composition est indiquée dans le tableau 3 (voir exemple 9).

La suspension cellulaire s'établit en 2 ou 3 semaines. Chaque suspension est ensuite repiquée toutes les 3 semaines par filtration des suspensions sur trois tamis empilés, donnant lieu à trois fractions (par exemple > 1 mm ; > 500 µm, > 100 µm). Une partie de chaque fraction est remise en suspension dans du milieu liquide, par exemple le milieu MSB1, et ces nouvelles suspensions sont agitées. L'observation





des différentes suspensions permet de distinguer la présence de deux types cellulaires, notamment :

- type habitué (A) : suspension fine, verte à croissance rapide, et qui régénère ponctuellement des formations vitrifiées se développant difficilement ;

- type noduleux (C) : suspension d'agrégats compacts jaunâtres, à croissance plus lente, régénère plus fréquemment que la première, des structures embryonnaires compactes se développant assez bien. Ce type est aussi connu sous le nom "type régénérant".

En revanche, la production d'une dispersion des cals s'effectue par dispersion des cals apparus depuis 2 à 6 semaines sur les explants, dans un milieu de culture liquide contenant 0 à 3,0 mg l<sup>-1</sup> cytokinine, par exemple le milieu MSB1. Les deux types cellulaires, habitué et noduleux, peuvent aussi être observés dans les dispersions. Les cals en dispersion peuvent être examinés avant la transformation dans le but de séparer les deux types cellulaires, c'est-à-dire noduleux et habitué. Un examen visuel des cals permet de repérer les deux types qui sont ensuite enlevés du milieu avec une pince et redispersés. Les suspensions cellulaires soigneusement initiées à partir de dispersions de cals blancs friables noduleux se sont avérées être le matériel idéal pour optimiser l'efficacité de la transformation.

Chacun des deux types cellulaires peuvent être soumis à la transformation mais il est préférable de transformer le type noduleux si la régénération de la plante est désirée ultérieurement.

La suspension cellulaire ou la dispersion des cals est ensuite mise en contact avec la bactérie Agrobacterium tumefaciens.

Le protocole de transformation est le même, qu'il soit effectué sur des suspensions cellulaires ou sur



les dispersions. Un échantillon des bactéries dans du milieu frais est ajouté à la suspension ou à la dispersion des cellules de betterave. La coculture des cellules végétales et des bactéries se fait à l'obscurité pendant trois jours environ, en chambre de culture.

L'Agrobacterium utilisé dans la transformation contient un vecteur portant un gène destiné à être introduit dans les cellules de betterave. Les souches utilisées par les inventeurs contiennent des vecteurs binaires portant le gène d'intérêt. Les trois souches d'Agrobacterium tumefaciens désarmées utilisées dans le travail décrit ici sont LBA 4404 (Hoekema et al, 1983 ; EHA 101 (Hood et al, 1986) ; C58'3 (Dale et al, 1989). Bien évidemment, le gène d'intérêt est placé sous le contrôle de signaux régulateurs appropriés, par exemple un promoteur permettant son expression dans la cellule végétale et, le cas échéant, dans la plante transgénique régénérée. Le promoteur peut être choisi pour permettre l'expression spécifique du gène dans une certaine partie de la plante, ou à un certain stade de son développement. En revanche, un promoteur constitutif peut être utilisé, donnant lieu à l'expression ubiquitaire du gène introduit.

Comme gène, on peut citer des gènes codants pour des caractères agronomiques intéressants, par exemple la résistance aux herbicides, aux insectes et aux virus, ou encore un gène induisant la stérilité mâle. La résistance aux herbicides peut être conférée, par exemple par le type de gène décrit par De Block et al (1987) et par Bedbrook et al (1988). Un gène susceptible de conférer une résistance aux insectes est le gène de la protéine cristalline de B. thuringiensis (Perlak et al (1990) ; Vaeck et al (1987) ; Fischhoff D, et al (1987)) La stérilité mâle



peut être induite par un gène codant pour un ribonucléase, tel que celui décrit par Mariani et al (1990). La résistance aux virus peut parfois être induite par le gène codant pour la protéine de capsid du virus en question. Par exemple, la résistance au virus BWYV peut être conférée par le gène décrit par Gielen et al (1990). Par ailleurs, une protection contre le BNYVV, responsable de la rhizomanie, peut également être induite par ce même type de gène. Selon le procédé de l'invention, ce gène codant pour cette protéine de capsid peut être introduit dans des cellules de betteraves, conférant ainsi la résistance à la rhizomanie. Les vecteurs décrits dans ces exemples peuvent être utilisés pour l'introduction de ces gènes.

Le vecteur porte également un gène codant pour une protéine permettant la sélection des transformants, par exemple la néomycine phosphotransférase (NPT II) qui confère la résistance à la kanamycine. De plus, un gène "reporteur" peut être introduit dans le vecteur afin de pouvoir confirmer le caractère transformé du tissu végétal. Un exemple d'un tel gène reporteur est le gène uid A d'E. coli codant pour l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase. Le dosage de l'activité enzymatique de cette protéine se fait facilement avec des substrats chromogènes ou fluorescents.

Après la coculture des cellules de betteraves et des bactéries, une étape de lavage avec un agent bactériostatique est effectué pour éliminer les bactéries. Comme agent bactériostatique, la cefotaxime peut être utilisée. Le lavage peut être effectué en deux étapes, par exemple une première fois avec le milieu MSB1 contenant 600 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime, puis une



deuxième fois dans du milieu MSB1 contenant 300 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> cefotaxime.

Ensuite, la sélection des cellules transformées est effectuée grâce au gène codant pour la résistance à l'agent sélectif. Les cellules lavées sont donc mises en culture pendant une quinzaine de jours sur un milieu contenant l'agent sélectif, par exemple la kanamycine et l'agent bactériostatique. Les cellules végétales sont ensuite repiquées sur du milieu frais.

Trois à huit semaines après la coculture, des cals blancs apparaissent. Ces cals transformés présentent les deux types cellulaires, noduleux et habitué.

Les cals transformés ainsi obtenus ont, comme caractéristique physique principale, qu'ils peuvent être dispersés en liquide par une agitation relativement douce et cela, dès qu'ils ont une taille de 3 à 5 mm. D'une manière surprenante, ces cals transformés conservent la nature blanche, friable et régénérante qu'ils possédaient avant la transformation, et s'avèrent donc être un matériel approprié pour la régénération de plantes transgéniques. Il est à noter que la transformation effectuée sur explants, et non sur cals (Harpster et al, 1988), donne lieu à des cals transformés très compacts qui ne présentent pas de caractère friable et qui ne sont pas régénérants.

Quand ils sont suffisamment développés, les cals transformés de l'invention sont repiqués sur un milieu MSB1 avec de la céfotaxime et éventuellement de la kanamycine.

D'une manière surprenante, il a été constaté qu'un mois après le clonage des cals transformés, la kanamycine et la céfotaxime peuvent être supprimés du milieu sans que la bactérie ne se développe. Ceci peut





présenter un avantage pour l'étape de régénération, les cellules n'étant plus en contact avec les antibiotiques.

Après l'obtention des cals friables transformés, la régénération de la plante transgénique peut être initiée, en commençant par la régénération de bourgeons et/ou d'embryons transgéniques.

Le procédé de régénération de bourgeons et/ou d'embryons transgéniques selon l'invention est caractérisé par l'obtention de cals friables transformés selon le procédé décrit ci-dessus, suivie du repiquage des cals friables transformés sur un milieu de culture, par exemple le milieu M.S, contenant 0 à 3,0  $\text{mg l}^{-1}$  d'une cytokinine et éventuellement un agent bactériostatique et un agent sélectif. Comme cytokinine, on peut citer la zéatine, la kinétine et la BAP, par exemple à une concentration de 1  $\text{mg l}^{-1}$ . La BAP est particulièrement préférée.

Des bourgeons et/ou embryons régénèrent sur certains des cals après des délais variant d'une semaine à plusieurs mois.

A partir de ces bourgeons et/ou embryons transgéniques, il est possible, selon l'invention, de régénérer des plantes par repiquage des bourgeons et/ou embryons sur un milieu de culture tel que le milieu M.S contenant une cytokinine à faible concentration, par exemple entre 0,05 et 0,15  $\text{mg l}^{-1}$ , de préférence 0,1  $\text{mg l}^{-1}$ . La BAP est préférée dans cette étape. Les structures régénérées commencent alors à développer des feuilles et elles sont remises en multiplication végétative en pots ou boîtes. Les bourgeons les plus développés sont alors mis sur un milieu d'enracinement tel que le milieu MS contenant de l'acide naphthalène-acétique, par exemple 1  $\text{mg l}^{-1}$ .



Les racines apparaissent 2 à 6 semaines après. Les plantes peuvent alors être acclimatées en serre.

L'invention concerne également la production de graines à partir des plantes transgéniques par vernalisation de ces plantes transgéniques et récolte des graines après floraison.

L'invention concerne également les cals friables transformés, les bourgeons et/ou embryons transformés, les plantes transgéniques et les graines de ces plantes susceptibles d'être produits selon les procédés décrits ci-dessus.

La présente invention concerne également la transformation génétique et la régénération de la betterave à sucre (Beta vulgaris ssp saccharifera) dans le but de créer des plantes résistantes à la rhizomanie.

Plus particulièrement, les inventeurs ont transformé des cellules végétales par des séquences codant pour la protéine de capsid du BNYVV, ou pour des variantes de celle-ci.

La mise en oeuvre de cet aspect de l'invention a consisté à :

- construire par les techniques de recombinaison génétique in vitro, des gènes artificiels, potentiels de résistance au virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave à sucre (BNYVV : Beet Necrotic Yellow Vein Virus) provoquant la rhizomanie,
- transférer de façon stable ces gènes de résistance dans des betteraves à sucre.

Le gène codant pour la protéine de capsid du BNYVV a été localisé et séquencé (Bouzoubaa et al, 1986). Cependant, il ne pouvait pas être prévu que l'expression de cette protéine dans des cellules de betterave inhiberait le développement du virus. Le virus étant transmis par le champignon du sol Polymixa



betae, la voie d'infectabilité n'est pas comparable à celle des virus pour lesquels la protéine de capsid s'est montré protectrice. D'autre part, la protéine de capsid du BNYVV est codée par l'extrémité 5' du ARN2, ce qui veut dire que la protéine peut être traduite dans la cellule infectée immédiatement après l'infection. Pour d'autres virus, la protéine de capsid est codée par un ARN subgénomique et est donc produite plus tard dans le cycle de l'infection. Pour ces raisons, l'effet protecteur présenté par la protéine de capsid pour d'autres virus végétaux ne pouvait pas être prévu chez le BNYVV.

De plus, les inventeurs ont constaté plusieurs phénomènes inattendus : premièrement, il a été observé que des cellules transformées par une même séquence codant pour la protéine de capsid de 22 Kd (nucléotides 145 à 708) et au moins une partie de la protéine de 75 Kd qui est composée de la protéine de 22 Kd fusionnée avec la protéine 54 Kd (nucléotides 709 à 2218), donne lieu à l'expression de deux protéines dans la même cellule, c'est-à-dire la protéine de 22 Kd et une protéine chimérique composée de la protéine de 22 Kd additionnée de la partie de la protéine de 75 Kd codée par la séquence transformante. Cette expression est le résultat du phénomène de "readthrough", le codon "stop" à la fin de la protéine de 22 Kd étant parfois supprimé dans la cellule par des tRNA supprimeurs. Il a été constaté que le taux d'expression de la protéine chimérique de "readthrough" est particulièrement élevé, et pourrait jouer un rôle dans la résistance conférée à la cellule exprimant les deux protéines à la fois.

Deuxièmement, les inventeurs ont observé que dans des plantes transgéniques les protéines exprimées selon l'invention sont exprimées spécifiquement dans



les racines, et ce malgré l'utilisation de promoteurs constitutifs.

Ce phénomène est totalement inattendu et présente plusieurs avantages pour la plante. Tout d'abord, les cellules cibles du BNYVV sont spécifiquement protégées. De plus, l'absence d'expression de la protéine de capsid et de ses dérivés dans les parties aériennes de la plante, partie qui n'est pas susceptible d'être infectée par le BNYVV, représente une économie énergétique importante pour la plante. Par ailleurs, l'expression dans les racines, à l'exclusion de toute expression dans d'autres parties de la plante, est un phénomène qui n'aurait pas pu être obtenu en utilisant un promoteur dit "spécifique" pour les racines. Ce genre de promoteur conduit, en fait, à une expression plus importante dans les racines, et une expression faible dans les autres parties de la plante. Des expériences, effectuées par les inventeurs, utilisant un gène marqueur (GUS) ont démontré que l'expression spécifique n'est pas dû à un mauvais fonctionnement du promoteur, puisque le produit d'expression du gène GUS est exprimée dans toutes les parties de la plante, lorsqu'elle est sous le contrôle de ces mêmes promoteurs. L'expression spécifique pourrait être le résultat de l'instabilité de la protéine dans les parties aériennes de la plante, ou à une mauvaise traduction. Ces expériences montrent que le promoteur ne semble pas jouer de rôle dans l'expression spécifique.

Il a également été constaté que le promoteur 35S a une efficacité de transcription de 30 à 50 fois plus élevée que le promoteur Nos dans des cellules de betterave.

L'invention concerne des plantes transgéniques produisant :





- la protéine de capsid du BNYVV,
- des protéines de capsid modifiées définies ci-dessous (acides aminés supplémentaires, acides aminés permutés, acides aminés délétés), qui conservent l'effet protecteur vis-à-vis du BNYVV
- des ARN sens et des ARN antisens de différentes tailles et dirigés contre différentes régions de l'ARN2 du BNYVV.

Plus particulièrement, cet aspect de l'invention concerne une plante transgénique appartenant à l'espèce Beta vulgaris et résistante à l'infection par le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave à sucre (BNYVV), ladite plante étant transformée d'une manière stable par un fragment d'acide nucléique, dont le produit d'expression est capable de conférer ladite résistance, ledit fragment étant dérivé de l'extrémité 5' de l'ARN2 génomique ou subgénomique du BNYVV, ou du CADN correspondant, ce fragment codant pour au moins une partie des protéines codées par les nucléotides 145 à 3285 de la séquence sauvage de l'ARN2, et étant sous le contrôle d'un promoteur permettant l'expression du fragment dans les cellules de la plante et étant dans l'orientation sens ou antisens.

Dans le contexte de l'invention, un fragment "dérivé de l'extrémité 5' de l'ARN2 du BNYVV" signifie le CADN correspondant, ou une variante capable d'hybrider avec celui-ci dans des conditions non stringentes, ou dont le produit d'expression présente au moins 80 % d'homologie. Il est important que les variantes présentent la propriété de pouvoir inhiber l'infection par le BNYVV dans des cellules l'exprimant. Par "inhiber", il faut comprendre une réduction et un retard significatifs de l'apparition des symptômes de l'infection et de la multiplication



du virus. Dans des conditions optimales, les symptômes et la multiplication du virus sont éliminés totalement.

Comme exemple de fragment d'acide nucléotidique préféré, on citera un fragment de l'extrémité 5' de l'ARN2 génomique du BNYVV ou du cDNA correspondant, codant pour au moins une partie de la protéine codée par les nucléotides 145 à 2218 du ARN2 ou pour une variante de cette protéine présentant une homologie d'au moins 80 % et comportant l'insertion, la substitution ou la délétion d'acide(s) aminé(s) et qui confère une résistance à la rhizomanie aux cellules l'exprimant.

Un autre exemple d'une plante transgénique selon cet aspect de l'invention est celle dans laquelle ledit fragment code pour la protéine codée par les nucléotides 145 à 708 et, en outre, pour une partie de la protéine codée par les nucléotides 709 à 2218 de l'ARN2 du BNYVV. Une telle plante transgénique peut comporter, selon l'invention, un fragment qui code pour la protéine codée par les nucléotides 145 à 871 de l'ARN2 du BNYVV, ce fragment pouvant être composé, par exemple, par les nucléotides 91 à 871 de l'ARN2 du BNYVV.

Le fragment transformant peut aussi coder pour au moins une partie d'une variante de la protéine codée par les nucléotides 145 à 2218, ladite variante se distinguant de la séquence sauvage par la présence de la séquence Glu Asp Leu Pro qui remplace les acides aminés His ALa codés par les nucléotides 253 à 258 de la séquence sauvage. Par séquence sauvage, il faut comprendre la séquence de l'ARN2 publiée par Bouzoubaa et al (1986), en particulier celle de la figure 2 de ladite publication. Cette figure indique la séquence nucléotidique ainsi que la séquence d'acides aminés.



La numérotation des bases utilisée dans cette demande est la même que celle appliquée par Bouzoubaa et al.

Comme exemples de parties de ce type de variante, on peut citer un fragment qui est composé par les nucléotides 91 à 871 de la séquence sauvage, les nucléotides 253 à 258 de la séquence sauvage étant remplacés par ceux codant pour Glu Asp Leu Pro. La partie de la variante peut aussi correspondre à celle codée par les nucléotides 145 à 255 dans la séquence sauvage, les nucléotides 253 à 255 de la séquence sauvage étant remplacés par ceux codant pour Glu.

Encore un exemple d'une plante transgénique selon cet aspect de l'invention est celle dans laquelle ledit fragment code pour au moins une partie d'une variante de la protéine codée par les nucléotides 145 à 2218, ladite variante se distinguant de la séquence sauvage par la présence de la séquence Arg Ser Ser Gly au lieu des acides aminés codés par les nucléotides 637 à 651 de la séquence sauvage, la séquence Arg Ser Ser Gly formant le carboxy-terminal de la protéine.

Plus particulièrement, les plantes transgéniques, selon ces aspects de l'invention, expriment des fragments d'acide nucléique consistant en les nucléotides 91 à 871 du ARN2 du BNYVV ou de la séquence cADN correspondante, dans lequel les nucléotides 253 à 258 sont éventuellement remplacés par GAA GAT CTT CCT, ou dans lequel la séquence GA AGA TCT TC a été insérée à la position 638, immédiatement après le C en position 637, ou encore les fragments BglIII de ces séquences.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment transformant peut consister en les nucléotides 2078 à 2774 du ARN2 subgénomique du BNYVV. La protéine ainsi exprimée correspond au NH<sub>2</sub> terminal de la protéine de 42kDa du BNYVV.



Des exemples de fragments d'acide nucléique transformants particulièrement préférés et les protéines codées par ces fragments sont illustrés dans le tableau 1 (voir exemple 6).

Parmi ces séquences particulièrement préférées, on citera la séquence de bases consécutives codant pour au moins une partie de la protéine de capsid de 22 Kd (codée par les nucléotides 145 à 708) et, en outre, pour une partie de la protéine de 75 Kd (codée par les nucléotides 709 à 2218). Un exemple d'une telle séquence est celle composée des nucléotides 91 à 871 du ARN2. Ce type de séquence incluant le codon stop du 22 Kd donne lieu au phénomène de "readthrough" et la cellule exprime ainsi deux protéines à la fois.

L'invention concerne également les protéines produites par l'expression de ces séquences, et en particulier la protéine de 29 Kd résultant de l'expression des nucléotides 91 à 871 du ARN2, qui est exprimée en même temps que la protéine de capsid de 22 Kd.

Les promoteurs qui peuvent être utilisés dans les plantes transgéniques résistantes à la rhizomanie sont tous ceux qui permettent l'expression de la séquence conférant la résistance dans la plante. Les promoteurs 35S et Nos qui sont, respectivement le promoteur du grand transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et le promoteur du gène de la nopaline synthase sont particulièrement préférés. L'utilisation de ces promoteurs constitutifs, et en particulier le p35S, donne lieu d'une manière surprenante à une expression spécifique de la protéine protectrice dans les racines.

D'autres signaux de transcription à utiliser avec le promoteur sont des terminateurs, par exemple Nos.





Les graines des plantes transgéniques résistantes à la rhizomanie font également partie de cet aspect de l'invention.

Les séquences utilisées dans la transformation des plantes de l'invention peuvent être utilisées comme sonde nucléique, en combinaison avec des moyens permettant une détection de l'hybridation, pour détecter la présence des séquences dans des cellules transformées. Ceci peut être utile pour vérifier l'état transformé des cellules.

Cet aspect de l'invention concerne également un procédé de production de plantes transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris et résistante à l'infection par le BNYVV, ladite plante exprimant, spécifiquement dans les racines, une protéine capable de conférer ladite résistance, ledit procédé comprenant la transformation, par l'intermédiaire d'Agrobacterium tumefaciens, de cellules provenant de Beta vulgaris avec un des fragments tels que décrits ci-dessus, la transcription dudit fragment étant sous le contrôle d'un promoteur constitutif tel que le p35S ou le pNos, suivi de la régénération d'une plante transgénique à partir des cellules transformées.

Les différents aspects de l'invention seront illustrés par les exemples non limitatifs suivants. Ces exemples illustrent notamment :

- la production de fragments de message génétique modifié ou non du virus du BNYVV, par la plante,
- l'expression de ces fragments d'ADN d'origine virale sous des promoteurs constitutifs (35S ; Nos),
- la vérification de cette expression par la mise en évidence des ARN messagers correspondants dans des suspensions cellulaires habituées et transformées,



- la confirmation de la production dans la même cellule de deux protéines de tailles différentes codées par le même gène :

- \* la protéine de capside du BNYVV de 22 Kd (188, acides aminés)

- \* la protéine chimérique dérivée de la protéine de capside, de 29 Kd (252 acides aminés),

- l'utilisation des trois souches désarmées d'Agrobacterium tumefaciens pour la transformation de suspensions cellulaires et de cals friables de betterave,

- l'obtention de suspensions cellulaires transformantes, induites à partir de cals sélectionnés sur kanamycine après transformation de suspensions cellulaires habituées,

- l'utilisation de ces suspensions cellulaires transformées comme modèle pour tester l'expression de tout fragment d'ADN placé sous le contrôle de promoteurs appropriés,

- l'utilisation de ces suspensions cellulaires pour tester l'inhibition de la multiplication virale par un gène donné,

- l'inhibition de la multiplication du BNYVV dans des protoplastes issus de suspensions cellulaires transformées et produisant les deux protéines de 22 Kd et 29 Kd, des protoplastes servant comme modèle pour tester l'infectabilité de la cellule, les cellules ne pouvant pas être infectées directement par les virus,

- la transformation de jeunes cals friables organogènes,

- l'obtention de cals transformés organogènes sélectionnés sur kanamycine après transformation de jeunes cals friables organogènes,

- la possibilité de supprimer très tôt à la fois l'agent sélectif (kanamycine) et l'agent



bactériostatique (céfotaxime) du milieu de culture des cals,

- le développement des bourgeons ou embryons initiés à partir des cals transformés, en plantes transformées enracinées,

- l'expression dans la plante des gènes transférés,

- la mise en évidence de la production des protéines 22 et 29 Kd spécifiquement dans les racines de betteraves transformées,

- l'absence de la production de protéines 22 et 29 Kd dans la partie aérienne des plantes transformées,

- la production de graines transgéniques à partir de transformants primaires,

- la mise en évidence de la résistance à la rhizomanie des plantules issues des graines transgéniques.

Les figures 1 à 11 et les tableaux 1 à 3 illustrent différents aspects de l'invention, notamment :

**Figure 1 :**

Organisation génétique de l'ARN2 du BNYVV d'après Bouzoubaa et al, (1986)

**Figure 2 :** construction des vecteurs d'expression pBIOS1 et pBIOS3.

pBIOS1 contient le promoteur (pNos) et le terminateur (Nos 3') du gène de la nopaline synthétase séparés par un site de restriction BamHI (B) et encadrés par deux sites EcoRI (E).

pBIOS3 est un dérivé de pBIOS1 où le promoteur Nos a été remplacé par le promoteur du transcrit 35S (p35S) du Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) isolé du plasmide pJEA25 (don de T. Michael).



Abréviations : B, BamHI - E, EcoRI - H, Hind III  
- Hp, HphI - P, Pst I - S, SmaI - Sst, SstI - X, XhoII  
- T4 DNA pol, T4 DNA polymérase - K, klenow polymérase  
- E Met, EcoRI Méthylase - Ap, Ampicilline - bp, paire  
de base.

**Figure 3** : gènes chimériques codant pour la protéine de capsid du BNYVV et pour la protéine chimérique dérivée.

A partir du plasmide pBC2 contenant l'ADN copie de l'extrémité 5' du RNA2, nous avons isolé un fragment DraI-Bgl I de 780 bp (position 91 à 871). Ce fragment a été traité par la T4 DNA polymérase et des linkers BamHI ont été rajoutés permettant son clonage au site BamHI des vecteurs d'expression pBIOS1 et pBIOS3. Les deux plasmides pBI01-1B et pBI03-1B obtenus ont le fragment d'ADN en orientation sens.

Abréviation : B, BamHI - D, Dra I - E, EcoRI - P, PstI - Sst, Sst 1 - T4 DNA Pol, T4 DNA Polymérase - CAP, départ théorique du transcrit - A+, signal de polyadénylation - ATG, codon de départ - TGA, TAA, codons stop.

**Figure 4** : construction de pBI01-2B et pBI01-5B.

**Figure 5** : construction des vecteurs de transfert.

Les différentes entités génétiques fonctionnelles dérivées de pBIOS1 et de pBIOS3 sont insérées dans le vecteur binaire pGA492. Les dérivés de pBIOS1 sont clonés au site EcoRI et seuls sont retenus les construits orientés dans le sens de transcription identique au gène de la néomycine phosphotransférase (npt), alors que les dérivés de pBIOS3 sont insérés entre le site SstI et le site EcoRI, et se trouvent obligatoirement dans la bonne orientation. 32 plasmides dérivés de pGA492 ont donc été obtenus.





Abréviations : E, EcoRI - Sst, SstI - npt, néomycine phosphotransférase - cat, chloroamphénicol acétyltransférase - BR et BL, bordures droite et gauche du T-DNA - Tet, tétracycline résistance - Kb, kilobase.

**Figure 6 : vecteur binaire pGA- $\beta$ -3-1B.**

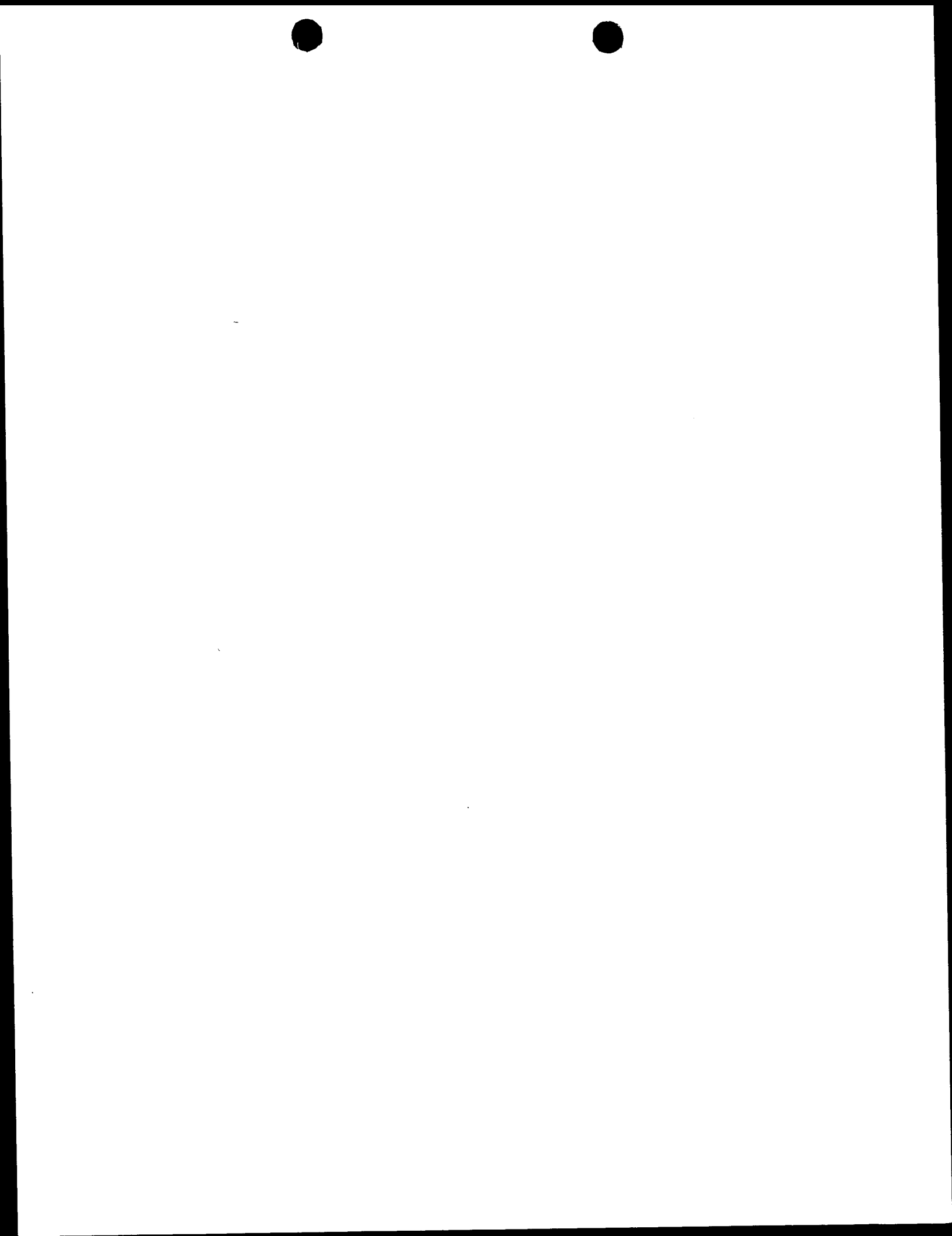
Légende : 35S, promoteur 35S du Cauliflower Mosaic Virus - 5'Nos, promoteur du gène de la nopaline synthase - Nos, terminateur du gène de la nopaline synthase. NPT, gène de la néomycine phosphotransférase -UID A, gène de la  $\beta$ -glucuronidase d'E. coli - BR et BL, bordures droite et gauche du T-DNA de pTiT 37 - amp, gène de résistance à l'ampicilline - tet., gène de résistance à la tetracycline - Kana., gène de résistance à la kanamycine - E, EcoRI - H, Hind III - S, Sst I - ●, origine de répllication du RK2.

**Figure 7 : analyse par Western blot des suspensions cellulaires transformées par le vecteur binaire pGA- $\beta$ -3-1B.**

Légende : CP, protéine de capsid - WT, suspension non transformée - 20 ng et 2 ng, reconstructions avec les quantités indiquées de BNYVV  $\beta$ -Glu,  $\beta$ -glucuronidase - MW, marqueur de poids moléculaire.

En encadré, la structure du gène chimérique codant pour la protéine de capsid est représenté. p35S, promoteur du Cauliflower Mosaic Virus - Nos, terminateur du gène de la nopaline synthase ; tag, codon de terminaison du BNYVV : readthrough - tag, codon de terminaison situé dans le terminateur - atg, codon d'initiation.

**Figure 8 : infection de protoplastes de betterave par du BNYVV F13 ( $\square$ , 0) et S2 ( $\nabla$ ) par la méthode au PEG. ( $\blacktriangle$ ) représente les résultats obtenus avec du virus inactivé.**



**Figure 9 :** infection de protoplastes de betterave par électroporation en présence (▼) et en absence (Δ) de  $\text{CaCl}_2$  5 mM. Les symboles ouverts correspondants représentent le pourcentage de protoplastes viables en présence (▼) et en absence (□) de  $\text{CaCl}_2$  5 mM.

**Figure 10 :** profils densitométriques d'analyses de RNA extraits de protoplastes infectés isolés de lignées exprimant (----) ou n'exprimant pas (—) la protéine de capsid du BNYVV.

**Figure 11 :** analyse par Western blot d'extraits protéiques de 3 betteraves transgéniques à l'aide de deux sérums : un sérum anti-BNYVV et un sérum anti- $\beta$ -glucuronidase.

Abréviations : L, limbe ; P, pétiole ; R, racine ; Te, témoin ; S, suspension cellulaire transformées ; 2ng, 2ng de BNYVV purifié ; 14-3, 22-1 et 68-1 réfèrent à 3 betteraves transgéniques différentes.

**Tableau 1 :** les 16 gènes de résistance potentiels au BNYVV avec leurs produits théoriques.

N.B. : les chiffres entre parenthèses réfèrent la position des sites de restrictions selon la séquence du BNYVV ; Δ représente le linker BglII additionné. La taille des transcripts correspond à la partie du messager complémentaire du BNYVV.

**Tableau 2 :** infection par le BNYVV de protoplastes issus de cellules transformées et non transformées.  $1 \times 10^6$  protoplastes ont été inoculés avec 5  $\mu\text{g}$  de BNYVV (F13 ou S2) sauf pour l'expérience 4 où l'inoculum consistait de 30  $\mu\text{g}$  de BNYVV les chiffres représentent le pourcentage de protoplastes fluorescents détectés 30 h après l'inoculation. CP+ et CP- sont des lignées cellulaires transformées exprimant et n'exprimant pas la protéine capsidaire du BNYVV.



**Tableau 3** : différents milieux de culture utilisés dans le procédé de transformation et de régénération selon l'invention.

**EXEMPLE 1 : EXTRACTION DE L'ARN VIRAL**

La multiplication du virus BNYVV se fait sur Chenopodium quinoa après inoculation manuelle, et l'extraction se fait à partir de feuilles virosées de huit jours selon la technique de Putz (1977). La suspension virale ainsi obtenue est ajustée à 100 mM NaCl puis soumise à deux extractions au phénol suivies de deux lavages à l'éther de la phase aqueuse. Les RNA viraux sont précipités par addition de deux volumes d'éthanol distillé et conservés à -20°C. Le nombre et la taille des RNA a été rapporté par Richards et al (1985).

**EXEMPLE 2 : FABRICATION DU cDNA DU RNA 2**

Richards et al ont montré en 1985 que le RNA 2 était un messenger efficace pour la synthèse de la protéine capsidaire. Un ADN complémentaire d'une partie du RNA 2 a été synthétisé par la méthode de Van der Werf et al (1981) et cloné au site Pst 1 du plasmide pBR322 (Bolivar et al, 1977). Le plasmide résultant pBC2 contient un ADN copie correspondant aux 2938 bases de l'extrémité 5' du RNA 2 (Richards et al, 1985).

**EXEMPLE 3 : DETERMINATION DE LA SEQUENCE DE L'EXTREMITE 5'DU RNA 2**

Grâce à la technique de Maxam et Gilbert (1980), et à celle de Sanger (1977), la séquence du clone pBC2 a été déterminée. La séquence détaillée est présentée dans la publication de Bouzoubaa et al (1986) avec l'organisation génétique du RNA2 schématisée. L'examen de cette séquence a confirmé la présence de la protéine de capside au niveau du 1er cistron situé en 5', le codon ATG de départ étant placé à 144



nucléotides de l'extrémité 5'. Cette protéine d'un poids moléculaire de 22 Kd comporte 188 codons et se termine par un codon ambre UAG. La composition en acides aminés déduite de la séquence est identique à celle de la protéine capsidaire du BNYVV déterminée par C. Putz (1977). Le codon stop (UAG) est immédiatement suivi d'une phase ouverte ayant une capacité codante correspondant à un polypeptide de 54 Kd. Par la suppression du codon UAG, on peut donc obtenir une phase de lecture ouverte capable de coder pour une protéine de 75 Kd. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus par Ziegler et al (1985) montrant que le RNA2 est un messenger efficace pour la synthèse de deux protéines immunoprécipitées par du sérum anti BNYVV et dont la synthèse est augmentée en présence d'un t.RNA suppresseur. Tous ces résultats sont discutés dans la publication de Bouzoubaa et al (1986), il est aussi précisé qu'une 3ème phase de lecture capable de coder in vitro pour une protéine se fait à partir d'un ARN subgénomique du RNA2 qui a été mis en évidence et qui peut être encapsidé.

#### EXEMPLE 4 : CONSTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION

Premièrement les signaux de transcription du gène de la nopaline synthase de la bactérie Agrobacterium tumefaciens T 37 ont été utilisés. A partir du plasmide pNopnéoΔ 18 construit par Bevan (1983) dont la structure est présentée dans la figure 2, celui-ci contient la séquence du vecteur de clonage pUC9 (Vierra et al, 1982) avec un fragment EcoRI-BamHI de 260 bp et un fragment HindIII-XhoII (BamHI-BglI) de 310 bp. Ces deux fragments qui proviennent du plasmide tumorigène pTiT37 d'Agrobacterium tumefaciens T 37 contiennent respectivement le signal de polyadénylation et le promoteur du gène de la nopaline





synthase. Ces deux signaux de transcription encadrent un fragment BglII-Bam HI de 1000 bp qui contient le gène codant pour l'aminoglycoside phosphotransférase II ; à partir de ce plasmide, le fragment de 1000 bp a été enlevé par digestion ménagée avec l'enzyme de restriction XhoII, et les molécules de taille de 3300 bp environ sont récupérées après migration sur gel d'agarose. Après ligation et transformation dans E. coli HB101 (Bolivar et al, 1979) des transformants résistants à l'ampicilline ont été sélectionnés. La majorité de ces techniques sont décrites dans "Molecular Cloning. A laboratory manual" (Maniatis et al, 1982). Grâce à la cartographie à l'aide d'enzyme de restriction, les inventeurs ont retenu le plasmide pNosΔNéo, qui possédait un fragment EcoRI-BamHI de 260 bp et un fragment BamHI-HindIII de 310 bp. Pour des commodités d'utilisation de ce plasmide, les inventeurs ont remplacé le site de restriction Hind III par un site EcoRI (détails non présentés) et ainsi ils ont obtenu le vecteur d'expression pBIOS1 (figure 2).

Un autre vecteur d'expression a été construit dans le cadre de l'invention. Il a la même structure que pBIOS1, le même fragment comportant le signal de polyadénylation, mais le fragment promoteur a été changé. En effet, le fragment PstI-BamHI comportant le promoteur du gène de la nopaline synthase a été remplacé par un fragment EcoRI-BamHI de 400 bp contenant le promoteur du grand transcrit 35S du virus de la mosaïque du choufleur (Ca.M.V.). Ce fragment a été obtenu à partir du plasmide pUC35S qui dérivait du clonage d'un fragment BamHI-HphI au site Sma I du vecteur de clonage pUC13 (Messing, 1983). La source du fragment BamHI-HphI était le plasmide pJEA25 construit par T. Michael qui avait prélevé un fragment Dde I



s'étendant de la position 7069 à la position 7569 du CaMV isolat BJ1 décrit par Franck et al (1980). Après avoir modifié les extrémités de ce fragment grâce à des linkers BamHI, T. Michael l'avait cloné au site BamHI du plasmide pAT153 (Twigg et al, 1980). Sur la figure 2, les différentes étapes de la construction du vecteur d'expression pBIOS3 sont schématisées.

Pour les deux vecteurs d'expression pBIOS1 et pBIOS3, le site de restriction BamHI est présent entre les deux fragments d'ADN contenant le promoteur pour l'un et pour l'autre le signal de polyadénylation ; cette situation est idéale pour l'insertion de tout DNA étranger qui sera un substrat pour la transcription.

#### EXEMPLE 5 : INSERTION DE FRAGMENTS cDNA DU BNYVV AU SITE BAMHI DES VECTEURS D'EXPRESSION

Le plasmide pBC2 a été digéré par les enzymes de restriction BglI et DraI et ensuite l'extrémité sortante du site BglI a été supprimée par l'utilisation de la DNA polymérase du bactériophage T4. Ce fragment a été purifié par élution à partir d'un gel d'agarose, après séparation électrophorétique. Des linkers BamHI ont été additionnés aux extrémités de ce fragment, et après une digestion avec un grand excès de l'enzyme de restriction BamHI ; ce fragment de 780 bp a été incubé avec les vecteurs pBIOS1 et pBIOS3 ouvert au site BamHI. Après ligation, le mélange a servi à transformer E. coli HB101. Après un tri effectué sur les clones résistants à l'ampicilline, 4 plasmides ont été retenus. Les plasmides appelés pBIO1-1B et pBIO3-1B qui ont le fragment cDNA contenant la séquence codante de la protéine de capsid sous le contrôle du promoteur Nos pour le premier et pour l'autre sous le contrôle du 35S (figure 3).



Ces plasmides peuvent diriger la fabrication de RNA messagers qui une fois traduits, produiront à la fois la protéine de capsid du BNYVV et une protéine chimérique de 29 Kd provenant de la suppression du codon stop (phénomène de readthrough). Cette protéine de 252 acides aminés est composée comme suit :

- les 188 acides aminés de la protéine de capsid,

- 53 acides aminés de la protéine de 75Kd allant de la position 189 à 241 inclus,

- de 11 acides aminés codés par la séquence du terminateur de la nopaline synthase qui sont respectivement : thréonine, glycine, serine, proline, isoleucine, leucine, glutamine, thréonine, phénylalanine, glycine, glutamine. Deux autres plasmides ont été obtenus, ces plasmides appelés pBIO1-1A et pBIO3-1A ont le fragment cDNA du BNYVV en orientation inverse sous le contrôle des deux promoteurs. Ces plasmides pourront diriger la fabrication de RNA messagers dits antisens, qui seront des messagers complémentaires de la partie 5' du RNA2.

#### EXEMPLE 6 : CONSTRUCTION D'UNE FAMILLE DE GENES PERMETTANT LA FABRICATION DE PROTEINES DE CAPSID DU BNYVV MODIFIEES ET DE RNA ANTISENS DE TAILLE VARIABLE

Deux plasmides dérivés de pBIO1-1B, le plasmide pBIO1-2B et le plasmide pBIO1-5B ont été construits. Les différentes étapes de la construction de ces plasmides sont présentées dans la figure 4. Brièvement pour la construction de pBIO1-2B, le plasmide pBIO1-1B a été ouvert au site SphI (position 256 du RNA2) les bouts "collants" ont été enlevés par l'utilisation de la DNA polymérase du bactériophage T4 (délétion de 4 bp) et des linkers BglII de 10 bp ont été ligasés aux extrémités franches ainsi produites. Après une digestion exhaustive avec BglII, le plasmide est



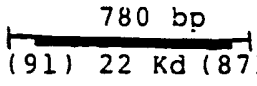
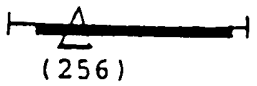


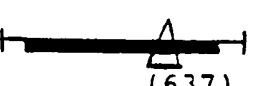


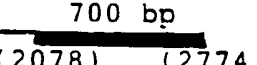
relié. Après transformation dans *E. coli*, le plasmide pBIO1-2B a été obtenu ; celui-ci ne contient plus de site SphI et à cette position on trouve maintenant un site BglII. Cette manipulation a permis deux choses : premièrement, l'obtention d'un site de restriction utile pour d'autres constructions (extrémités compatibles avec celles produites par BamHI) et deuxièmement, l'obtention d'une séquence codante modifiée qui code pour une protéine de capsid possédant deux acides aminés supplémentaires et dont deux acides aminés sont changés. Le plasmide pBIO1-5B a été obtenu par le même type de manipulation mais dans son cas c'est le site SmaI de pBIO1-1B (position 637 du RNA2) qui a été modifié par des linkers BglII. Ce plasmide code pour une protéine de capsid raccourcie de 19 acides aminés et dont les 4 derniers sont modifiés.

En utilisant les sites BglII et Bam HI de ces deux plasmides, les inventeurs ont pu isoler et cloner dans les deux vecteurs d'expression pBIO1 et pBIO3 différents morceaux de cDNA recouvrant l'extrémité 3' ou l'extrémité 5' de la protéine de capsid et ceci sur des longueurs variables. Une famille de gènes susceptibles de rendre résistante au BNYVV une cellule ou une plante fabriquant le produit d'un ou plusieurs de ces gènes a ainsi été obtenue. Tous ces différents fragments de cDNA sont présentés dans le tableau 1 avec les produits attendus (transcrit et protéine) ; la lettre B référant une orientation sens et A une orientation antisens.

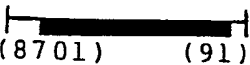











TABLEAU 1

CODE	FRAGMENT cDNA	TRANSCRIPT	PROTEINE
1B		ARN bon sens 780 bp	protéine de capside de 22 Kd (188 acides ami- nés) et protéine chimérique déri- vée 29 Kd (252 Aa)
2B		ARN bon sens 780 bp	Protéine de capside mutée (190 Aa)
3B		ARN bon sens 3' 165 bp	36 Aa NH2 terminal de la protéine de capsid
4B		ARN bon sens 5' 615 bp	
5B		ARN bon sens 780 bp	Protéine de capsid tronquée (169 Aa)
6B		ARN bon sens 5' 546 bp	164 Aa NH2 terminal de la protéine de capsid
7B		ARN bon sens 3' 234 bp	
8B		ARN bon sens 700 bp	215 Aa NH2 terminal de la protéine de 42 Kd



CODE	FRAGMENT cDNA	TRANSCRIPT	PROTEINE
1 A		ARN anti-sens 780 bp	
2 A		ARN anti-sens 780 bp	
3 A		ARN anti-sens 5' 165 bp	
4 A		ARN anti-sens 3' 615 bp	
5 A		ARN anti-sens 780 bp	
6 A		ARN anti-sens 5' 546 bp	
7 A		ARN anti-sens 3' 234 bp	
8 A		ARN anti-sens 700 bp	

N.B. : les chiffres entre parenthèses repèrent la position des sites de restrictions selon la séquence du BNYVV ; v représente le linker BglII additionné. La taille des transcripts correspond à la partie du messenger complémentaire du BNYVV.

Sur ce tableau, il est aussi présenté un fragment de cDNA s'étendant de la position 2078 à 2774 ; il s'agit d'un fragment Sau 3A du RNA2 correspondant à l'extrémité 5' du RNA subgénomique codant pour la protéine de 42 Kd (figure 1b). Les inventeurs ont cloné ce fragment dans les vecteurs d'expression pBIOS1 et pBIOS3 et ceci dans les deux orientations (8B et 8A).



**EXEMPLE 7 : INTRODUCTION DES GENES DANS UN VECTEUR BINAIRE**

Le vecteur binaire pGA492 choisi a été construit par G. An (1986). Ce plasmide a une taille de 12 kb, sa carte génétique est présentée dans la figure 5. Ce plasmide possède :

- deux fragments d'ADN contenant les séquences du T-DNA du plasmide tumorigène pTiT37, ces séquences délimitent la partie transférée et sont indispensables au transfert,

- un gène chimérique contenant la séquence codante du gène de la néomycine phosphotransférase du transposon Tn5 (Rothstein et al, 1981) qui est fusionné à un fragment contenant le promoteur du gène de la nopaline synthase et les premiers codons de la séquence codante de ce même gène. Ce gène chimérique est terminé par le signal de polyadénylation du gène de la nopaline synthase. Ce gène confère aux cellules végétales le contenant la capacité de se multiplier en présence de kanamycine, qui est normalement un antibiotique toxique pour celles-ci,

- plusieurs sites uniques de restriction permettant le clonage de gènes construits in vitro,

- une origine de répllication à large spectre d'hôte fonctionnant dans E. coli et dans Agrobacterium tumefaciens,

- une origine de transfert et les gènes mob nécessaires pour le transfert par conjugaison bactérienne,

- un gène de résistance à la tétracycline qui permet la sélection de bactéries transconjugates,

- un gène de résistance à la tétracycline qui permet la sélection de bactéries transconjugantes.

Sur la figure 5, les inventeurs ont exemplifié l'introduction de deux gènes, les gènes portés par



pBIO1-1B et par pBIO3-1B. Tous les fragments de cDNA sous le contrôle du promoteur Nos (pBIOS1 dérivés) sont clonés au site EcoRI de pGA 492 après isolement des gènes respectifs avec EcoRI. Seuls les clones présentant les gènes dans le même sens de transcription que celui du gène conférant la résistance à la kanamycine sont retenus. Pour les gènes contenant le promoteur 35S du CaMV (pBIOS3 dérivés) le clonage s'effectue entre les sites Sst I et EcoRI de pGA 492 après digestion des différents plasmides par ces deux mêmes enzymes. 32 vecteurs de transfert ont été obtenus, deux de ceux-ci sont présentés dans la figure 5, pGA-1-1B et pGA-3-1B.

**EXEMPLE 8 : INTRODUCTION D'UN GENE REPORTEUR DANS LE VECTEUR BINAIRE pGA-3-1B**

La confirmation du caractère transformé d'un tissu végétal s'effectue dans de nombreux cas par la mise en évidence des protéines codées par les gènes transférés. Dans le cas du vecteur binaire pGA-3-1B, les inventeurs ont pu doser par des techniques immunologiques la protéine de capsid du BNYVV et par un dosage enzymatique l'activité de la néomycine phosphotransférase qui confère la résistance à la kanamycine. Cependant, ces dosages sont longs et délicats et ils nécessitent une importante quantité de matériel végétal.

En 1987, Jefferson et al, utilisent le gène uid A d'E. coli codant pour l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase (GUS E.C.3.2.2.31) comme gène reporteur. Ce gène sous le contrôle de signaux de transcription végétaux (promoteur 35S du CaMV et terminateur Nos) s'exprime très bien dans les cellules végétales et l'enzyme se révèle très stable. Plusieurs méthodes de dosage de l'activité enzymatique de cette protéine sont disponibles car il existe différents types de





substrats ; en particulier des substrats donnant des produits chromogènes et des substrats donnant des produits fluorescents. On peut effectuer de façon simple et avec peu de matériel végétal des dosages quantitatifs (intensité de la fluorescence) et des dosages qualitatifs par histochimie (apparition d'un précipité bleu-indigo). Pour bénéficier de ce système reporteur dans les expériences de transformation, les inventeurs ont construit le vecteur binaire pGA- $\beta$ -3-1B. La structure génique de ce plasmide est présentée dans la figure 6. Le gène pouvant inhiber la multiplication du BNYVV est encadré par le gène conférant la résistance à la kanamycine et par le gène codant pour la  $\beta$ -glucuronidase. Pour réaliser cette construction, les inventeurs ont inséré au site EcoRI du vecteur binaire pGA-3-1B, le plasmide pBI221 (Jefferson, 1987) ouvert à son site EcoRI. Le vecteur binaire pGA- $\beta$ -3-1B résultant (d'une taille de 19 kb) a été transféré dans les souches d'Agrobacterium désarmées (LBA 4404, EHA 101, C58'3) par conjugaison triparentale selon la technique décrite par Ditta et al (1980).

#### EXEMPLE 9 : OBTENTION DE CALS FRIABLES REGENERANTS A PARTIR DE FEUILLES

Des graines de betterave sont semées dans du terreau en serre. Ces graines sont issues de la variété américaine "REL 1".

Environ un mois après la germination en serre, les premières expériences d'induction de cals selon la méthode décrite par Saunders et al (1986) ont été faites :

- de jeunes feuilles de 3 à 5 cm de long sont prélevées de chaque plante,
- elles sont désinfectées comme suit :



détergent de la marque Domestos 15 % pendant 5 minutes

3 rinçages à l'eau stérile

séchage sur papier filtre stérile

- chaque feuille est ensuite découpée en fragments de 0.25 cm<sup>2</sup> environ,

- les explants ainsi obtenus sont mis en culture sur du milieu MSB1 (Tableau 3) en boîtes de Pétri,

- les boîtes après avoir été scellées avec un film plastique de la marque Scello-frais sont placées à 30°C à l'obscurité pendant 30 jours,

- puis elles sont sorties en chambre de culture L:D 18:8, 25°C:20°C.

De 4 à 10 semaines après la mise en culture, des cals blancs friables apparaissent autour, sur ou sous les explants foliaires.

De 1 à 8 semaines après l'apparition de cals des bourgeons et/ou embryons commencent à régénérer de ces cals.

### TABEAU 3 : MILIEU DE CULTURE

#### MS :

Pour 1 litre :

4.4 g de milieu de Murashige et Skoog  
déshydratés de chez SIGMA réf. M6899.

Vitamines :

1 mg panthoténate de calcium

0,01 mg biotine

1 mg acide nicotinique

1 mg pyridoxine HCl

10 mg thiamine HCl

30 g saccharose

pH : 5.8

Milieu solide : 8 g agar-agar



MSB1 :

MS + 1 mg/l BAP

MSBo.1 :

MS + 0.1 mg/l BAP

MS enracinement :

MS + 1 mg/l ANA

## Etalement des cellules :

MSB1 + C = MSB + 300 mg/l céfotaxime

MSB1 + CK = MSB + 300 mg/l céfotaxime + 200 mg/l  
kanamycine

LB :

Pour 1 litre :

10 g bactotryptone

5 g yeast extract

10 g NaCl

**EXEMPLE 10 : OBTENTION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES  
A PARTIR DES CALS INDUITS**

De 4 à 6 semaines après leur apparition, les cals sont prélevés (en évitant toute structure organisée) et mis en culture dans 100 ml de milieu MSB1 liquide, dans les erlenmeyers de 250 ml fermés avec une feuille de cellophane maintenue au col par deux élastiques. Les erlenmeyers sont agités à 200 RPM environ dans la chambre de culture.

La suspension cellulaire s'établit en 2 ou 3 semaines. Chaque suspension est repiquée toutes les 3 semaines environ comme suit :

- le contenu de chaque erlenmeyer après 3 semaines de culture est filtré sur une série de trois tamis empilés (dont les mailles sont de 1 mm, 500  $\mu$ m et 100  $\mu$ m). Une partie de chaque fraction (>1 mm, >500 $\mu$ m, >100  $\mu$ m) est remise en suspension dans 100 ml



de milieu MSB1 frais en erlenmeyers de 250 ml. Ces nouvelles suspensions sont à nouveau agitées à 200 RPM. L'observation des différentes suspensions cellulaires établies à partir des différents génotypes ont permis de distinguer deux types cellulaires :

- \* type habitué (A) : suspension fine, verte à croissance rapide, régénère ponctuellement des formations vitrifiées se développant difficilement,

- \* type noduleux (C) : suspension d'agrégats compacts jaunâtres, à croissance plus lente, régénère plus fréquemment que la première, des structures embryonnaires compactes se développant assez bien.

#### EXEMPLE 11 : TRANSFORMATION DE SUSPENSIONS CELLULAIRES ET DE JEUNES CALS

##### Suspension cellulaire

La transformation est faite sur des suspensions cellulaires après 3 semaines de culture, sans repiquage.

Dans un tube plastique, stérile et gradué, on recueille une partie de la suspension de manière à avoir 5 ml de cellules tassées dans 10 ml de milieu. 10 ml milieu MSB1 frais sont rajoutés. La nouvelle suspension ainsi obtenue est distribuée dans quatre boîtes de pétri à raison de 5 ml par boîte.

Les souches d'Agrobacterium tumefaciens testées sont LBA 4404, EHA 101, C58'3. Chacune de ces souches contient des vecteurs binaires portant les gènes construits (exemples 5 et 6) et plus particulièrement le vecteur pGA- $\beta$ -3-1B (exemple 8).

Les souches bactériennes sont conservées à -20°C dans 15 % de glycérol. 50  $\mu$ l de chaque souche sont prélevés et mis en culture dans 2 ml de milieu LB + rifampicine + tetracycline. Les cultures sont agitées à 200 RPM à 30°C pendant 2 jours. Chaque souche est





repiquée dans du milieu frais et cultivée dans les conditions décrites plus haut pendant une nuit.

Quand les bactéries sont ainsi prêtes, l'infection des cellules végétales est faite :

- 50  $\mu$ l de chaque souche poussée une nuit sont prélevés et ajoutés à une des boîtes de Pétri contenant les cellules de betteraves décrites plus haut

- la coculture des cellules de betterave et des bactéries se fait à l'obscurité pendant 3 jours en chambre de culture

Après ces 3 jours, des cellules végétales sont lavées pour éliminer la bactérie, une première fois avec du MSB1 + 600 mg/l de céfotaxime (bactériostatique inhibant la croissance d'Agrobacterium), puis une deuxième fois dans du milieu MSB1 + 300 mg de céfotaxime

- les cellules ainsi lavées sont mises en culture sur un disque de papier Whatman stérile déposé sur du milieu MSB1 + CK (tableau 3), en boîtes de Pétri (la kanamycine est l'agent sélectif permettant aux seules cellules transformées de se développer). Les boîtes sont scellées avec du scello-frais et mises en chambre de culture. 15 jours après, les filtres portant les cellules végétales sont repiqués sur du milieu frais MSB1 + céfotaxime + kanamycine

- 3 à 8 semaines après la coculture, des cals blancs apparaissent sur un lit de cellules mortes.

Quand ils sont suffisamment développés, ces cals sont repiqués soit sur milieu MSB1 + CK ou MSB1 + C ; la plupart des cals poussent sur les deux milieux. Un test histochimique (Jefferson, 1987) pour déceler l'activité de la protéine codée par le gène de la  $\beta$ -glucuronidase dans les cellules de ces cals, a permis d'évaluer à environ 80 % le taux de cals positifs pour



ce test. Ceci confirme donc le caractère transgénique de la plupart des cals obtenus.

Le fait de cultiver ces cals sans l'agent sélectif (kanamycine) ne semble pas modifier l'expression du gène GUS. De plus, après un mois de culture sur milieu avec céfotaxime, les cals peuvent être sevrés de cet antibiotique sans que la bactérie se développe sur le milieu.

Donc, un mois après le clonage des cals, on peut se passer d'ajouter les deux antibiotiques dans le milieu de culture, sans inconvénient apparent. Ceci peut représenter un atout pour la régénération.

#### Dispersion de cals nouvellement induits

Au lieu de transformer des suspensions cellulaires induites depuis plusieurs mois (et ayant hypothétiquement perdu de leur potentiel de régénération), de jeunes cals fraîchement induits d'explants foliaires (Saunders et al, 1986) étaient transformés. Le potentiel organogène de ces cals transformés pouvait ainsi être investigué.

Pour tester cela, des cals juste apparus depuis 2 à 6 semaines sur feuilles de serre ont été prélevés. Ces cals ont été dispersés dans un milieu MSB1 liquide en tubes plastiques stériles, et le même protocole de transformation que pour les suspensions cellulaires a été appliqué. Des cals transformés ont ainsi été sélectionnés par cette voie.

#### **EXEMPLE 12 : EXPRESSION DES GENES POUVANT INHIBER LE DEVELOPPEMENT DU BNYVV DANS DES CELLULES DE BETTERAVE**

Les inventeurs ont transformé des suspensions cellulaires habituées de betteraves avec tous les gènes construits présentés dans les exemples 5 et 6. Pour chacun de ces gènes plusieurs suspensions cellulaires transformées ont été initiées et cultivées



en présence de kanamycine 200 mg/l. A partir de 10 g de cellules transformées soumises à l'action de cellulases et de pectinases, soit les ARN totaux, soit les protéines solubles totales ont été isolés.

Pour l'extraction des ARNs la technique utilisant l'isothiocyanate de guanidium décrite par Ausubel et al (1987) s'est révélée la plus efficace sur ces cellules aux parois digérées. Les ARN totaux ont été analysés par Northern blot selon Maniatis et al (1982). Pour l'hybridation des ARN totaux contenant un ARN message dérivé du gène de la protéine de capsid, les inventeurs ont utilisé comme sonde le fragment BamHI de 780 paires de bases du plasmide pBIO-3B. Pour ceux exprimant un ARN messager dérivé du gène codant pour la protéine de 42 Kd, le fragment EcoRI de 1330 paires de bases du plasmide pBIO-3-8B a été utilisé comme sonde. Le marquage radioactif de ces 2 sondes grâce à de l'ATP (P32) s'est fait par la technique dite de l'"Oligonucleotide Primed Synthesis" (Ausubel et al, 1987).

Les résultats obtenus ont permis aux inventeurs de vérifier la présence de tous les ARN messagers attendus, ce qui montrait la fonctionnalité des gènes chimériques construits. Ces messagers ont une taille correspondante à celle indiquée dans le tableau 1 majorée de 200 nucléotides environ. Ces nucléotides supplémentaires situés à l'extrémité 3' du mRNA sont dus à la partie transcrite du terminateur Nos jusqu'au signal de polyadénylation et à la queue de poly-A. Il a aussi été observé que le promoteur Nos a une efficacité de transcription de 30 à 50 fois plus faible que le promoteur 35S dans des cellules de betteraves. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur le tabac et la tomate par Sanders et al (1987).



Bien que la transcription de tous les gènes ait été vérifiée, il était nécessaire de voir si la traduction et la production de la protéine de capsid et de la protéine chimérique de 29 Kd a été obtenu dans le cas du vecteur binaire pGA- $\beta$ -3-1B. Pour cela il a été réalisé un western blot (Ausubel et al, 1987)) sur des protéines solubles extraites à partir de différentes suspensions cellulaires transformées (tampon d'extraction : urée, 9M ;  $\beta$ -mercaptoéthanol, 7,5 %, SDS, 4,5 % ; pH : 6,8). Les résultats sont présentés dans la figure 7 ; la partie supérieure du filtre a été révélée avec des anticorps polyclonaux anti  $\beta$ -glucuronidase et la partie inférieure par des anticorps polyclonaux anti-BNYVV. La  $\beta$ -glucuronidase est présente dans la majorité des suspensions transformées (bande immunoréagissante 68 Kd). Dix suspensions sur les 11 testées présentent une bande immunoréactive commigrant avec la protéine de capsid du BNYVV ainsi qu'une bande d'un poids moléculaire d'environ 29 Kd. L'expression de ces deux protéines est de l'ordre de 0,005 à 0,01 % des protéines solubles totales ; cette quantité atteste de la bonne efficacité de traduction du messenger produit. Il est à noter que la quantité de 29 Kd est particulièrement élevée dans la majorité des transformants et peut être supérieure à celui de la protéine de capsid. Le taux de readthrough dans les suspensions cellulaires habituées semble être supérieur à celui observé dans des racines de betteraves pour le RNA2 (Ziegler et al, 1985) et sur des betteraves transgéniques (exemple 15).





**EXEMPLE 13 : TEST DE RESISTANCE IN VITRO****Isolement et purification de protoplastes de betterave**

Cinq jours après le repiquage, 2 ml de suspension cellulaire tassée sont digérés dans 20 ml d'enzymes caylase. La composition du cocktail enzymatique est la suivante : 0.25 %, 345 S ; 0.25 % T ; 0.08 %  $M_2L$  dissout dans du mannitol 0.7 M contenant 0.08 mM  $NaH_2PO_4$ , 0.03 mM MES et 0.68 mM  $CaCl_2$ . La pression osmotique est ajustée à 760 mOsmole/Kg et à pH 5,8. après 16 à 18H00 de douce agitation (30 oscillations par minute) à l'obscurité et à 24°C, la suspension est filtrée sur tamis de 100 et 50  $\mu m$  respectivement. Le filtrat est additionné d'un volume égal d'une solution iso-osmotique de KCl à 470 mM et les protoplastes sont sédimentés à 50 g pendant 5 minutes. Le culot est repris dans du saccharose isoosmotique à 570 mM et centrifugé à 50 g pendant 15 minutes. L'anneau de protoplastes est prélevé, soumis à une deuxième centrifugation dans du saccharose, qui, sédimenté, est lavé deux fois dans du mannitol à 760 mOsmoles/Kg. La viabilité des protoplastes est quantifiée par coloration au diacétate de fluorescéine (Widholm, 1972). On s'assure que la digestion est complète par l'absence de coloration de paroi du calcofluor.

L'utilisation de gradients iso-osmotiques mais de densités différentielles a permis d'obtenir des préparations de protoplastes à très hauts rendements  $5 \times 10^6$  protoplastes par ml de cellules tassées et complètement débarrassés de débris cellulaires. En moyenne, 90 % des protoplastes sont viables.



Culture des protoplastes isolés de cellules non transformées et transformées

Le milieu de culture des protoplastes est un milieu de macro et micro éléments de Murashige et Skoog (1962) où le  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  est diminué de moitié et additionné de :

1g/l hydrolysate de caséine  
30 g/l saccharose  
7,7 mg/l glycine  
1,3 mg/l d'acide nicotinique  
0,25 ng/l pyridoxine  
0,25 n/l Thiamin-HCl  
400 mg/l glutamine  
25 mg/l glucosamine  
1 mg/l 6 benzyl amino purine  
1 mg/l acide indole acétique.

La pression osmotique est ajustée à 760 mOsmole/kg avec du mannitol et le pH à 5,8. Le milieu de culture est stérilisé par filtration.

Des protoplastes ont été isolés à partir de suspensions cellulaires transformées et non transformées. Ils ont été mis en culture dans le milieu ci-dessus en présence et en absence de kanamycine à 200 mg/l afin de calculer l'efficacité d'étalement. Les résultats démontrent que les protoplastes isolés à partir de cellules non transformées ne survivent pas sur milieu sélectif contenant 200 mg/l de kanamycine. Ceci est en accord avec l'absence d'échappement dans les expériences de transformation. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les efficacités d'étalement de protoplastes issus de cellules transformées en présence et absence de kanamycine. Ceci confirme donc l'absence de cellules non transformées au sein des lignées transformées. Lors d'expériences comparatives



qui seront décrites ci-dessous, les protoplastes issus de 4 types de lignées cellulaires ( $\beta 7$  et  $\beta 14$  exprimant la 22 Kd et la 29 Kd, WT, non transformées et  $\beta D$  transformée par le vecteur binaire pGA492) seront mis en culture en absence de pression de sélection.

Infection de protoplastes de betterave par le BNYVV

L'optimisation de la technique d'infection s'est effectuée sur des protoplastes issus de cellules non transformées. Les inventeurs se sont inspirés de la technique d'infection par le polyéthylène glycol décrit par Samac et al (1983) et de celle par électroporation décrite par Watts et al (1987). Afin d'obtenir des taux élevés d'infectivité, il était impératif d'utiliser des préparations de protoplastes dépourvues de débris, ayant des taux de viabilité supérieurs à 90 % ainsi que des préparations de virus âgées de moins de deux semaines.

La fréquence d'infection a été déterminée par immunofluorescence par une technique indirecte décrite par Maule et al (1980). Les protoplastes infectés ont une fluorescence vert clair caractéristique, dispersée dans le cytoplasme ; les protoplastes non infectés sont marron terne. La figure 8 présente les résultats de 4 expériences d'infection de protoplastes de betterave par la technique au polyéthylène glycol. Il a été constaté qu'après 24 heures de culture environ 60% des protoplastes sont infectés. Ce pourcentage n'évolue pas de façon significative pour des durées de culture supérieures à 24 h. L'infection s'est donc réalisée de façon quasi-synchrone. Cette figure montre aussi que du virus inactivé par congélations et décongélations répétées ne se réplique pas dans les protoplastes de betterave. Dans toutes les



expérimentations effectuées, en moyenne 50 % des protoplastes sont infectés.

Les inventeurs ont réussi à introduire des particules virales du BNYVV en utilisant des impulsions électriques (technique d'électroporation). Les inventeurs se sont inspirés de la technique décrite par Watts et al (1987) et ont utilisé un électroporateur à décharge de capacités (Guerche et al, 1987).

L'optimisation de la technique s'est faite en faisant varier la durée d'impulsion délivrée par des condensateurs de différentes capacités et la résistivité du milieu d'électroporation. C'est ainsi que les inventeurs ont vu que deux impulsions de 100 ms délivrées à 15 secs d'intervalle par des condensateurs de capacité 63  $\mu$ F chargés à 220 V à  $1 \times 10^6$  protoplastes remis dans du mannitol contenant du  $\text{CaCl}_2$  à 5 mM en présence de 5  $\mu$ g de BNYVV permettaient d'avoir un taux de 55 % de protoplastes infectés. L'omission du  $\text{CaCl}_2$  résulte en une diminution de l'infectivité d'un facteur 3, bien que la viabilité des protoplastes soit augmentée d'un facteur 2. Ceci est illustré sur la figure 9.

#### Infection de protoplastes de betteraves issus de cellules transformées et non transformées

Afin de déterminer si la protéine capsidaire (22 kD) du BNYVV et la protéine dérivée (29kD) produite dans les cellules de betterave pouvait inhiber la multiplication du virus, les inventeurs ont inoculé des protoplastes issus de cellules exprimant ou n'exprimant pas ces protéines par le virus. Les expériences ont été réalisées par les techniques au PEG et par l'électroporation. L'infection a été visualisée par immunofluorescence des cellules 30 heures après culture. Il n'a pas été décelé de bruit





de fond en immunofluorescence dans les cellules transformées et exprimant la protéine capsidaire avant inoculation.

TABLEAU 2 : infection par le BNYVV de protoplastes issus de cellules transformées et non transformées.

Expérience	Source protoplastes				Protection (%)
	Non transformé		Transformé		
	P11	$\beta 7$	CP <sup>+</sup>	CP <sup>-</sup>	
			$\beta 14$	$\beta D$	
1	30		1		97
2	68		10		85
3	70		4		94
4	27		1		96
5	35	5			86
6	25	2			92
7	37	10		36	73
8		12		48	75

$1 \times 10^6$  protoplastes ont été inoculés avec 5  $\mu$ g de BNYVV (F13 ou S2) sauf pour l'expérience 4 où l'inoculum consistait de 30  $\mu$ g de BNYVV les chiffres représentent le pourcentage de protoplastes fluorescents détectés 30 h après l'inoculation. CP<sup>+</sup> et CP<sup>-</sup> sont des lignées cellulaires transformées exprimant et n'exprimant pas la protéine capsidaire du BNYVV.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus avec deux lignées cellulaires ( $\beta 7$  et  $\beta 14$ ) exprimant fortement deux protéines, et la lignée cellulaire transformée ( $\beta D$ ) et la lignée cellulaire non transformée WT. Dans tous les cas, le pourcentage de protoplastes infectés



isolés de cellules transformées  $\beta 7$  et  $\beta 14$  est significativement plus faible que celui des protoplastes de cellules non transformées. Les expériences 7 et 8 prouvent bien que la protection est bien due à la présence des protéines 22 Kd et 29 Kd, car le taux d'infection de protoplastes issus des cellules de la lignée  $\beta D$  est comparable à celle des cellules non transformées. Donc le processus de transformation en lui-même ne confère pas de protection à l'infection par le virus. L'expression de protéines étrangères, autres que celles du BNYVV ne confère pas non plus la protection à l'infection par ce même virus. La protection n'est pas abolie lorsque l'on augmente la concentration du virus présente dans l'inoculum. Les profils densitométriques (figure 10) des RNA totaux (isolés de protoplastes  $\beta 14$  et WT infectés) et hybridés avec une sonde cDNA total contre les 4 RNA de BNYVV montrent que ceux-là ne se répliquent pas dans les protoplastes exprimant la protéine capsidaire du virus. La protection a aussi été observée lorsque l'inoculation a été effectuée par électroporation indiquant que la protection est indépendante de la méthode utilisée pour l'inoculation.

Ces résultats démontrent pour la première fois que des protoplastes de betterave exprimant la protéine capsidaire virale du BNYVV et la protéine chimérique dérivée sont protégés contre l'infection par ce même virus.

#### EXEMPLE 14 : REGENERATION DE PLANTES A PARTIR DE CALS TRANSFORMES

Après un premier passage d'un mois sur M.SB1 + C ou MSB1 + CK, les cals transformés sont repiqués tous les mois sur MSB1. Après des délais plus ou moins longs, variant d'une semaine à plusieurs mois, des



bourgeons et/ou embryons régénèrent sur certains de ces cals.

Il a été observé qu'après transformation les cals ont le même phénotype que la suspension de départ. C'est-à-dire que le type noduleux ou habitué se retrouve après la transformation. En outre, il semble que ce soit les cals transformés de type noduleux qui aient la plus grande aptitude à la régénération. Ils permettent la régénération de plusieurs structures se développant assez bien et vite en plante, alors que les structures obtenues sur les cals habitués transformés sont très rares, longues et très difficiles à se développer en plante.

Les structures régénérées sont très hétérogènes morphologiquement. Elles sont repiquées, après avoir été coupées à la base au scalpel, sur le milieu MSB0.1 en boîtes de Pétri.

Quand les bourgeons commencent à développer plusieurs feuilles, ils sont remis en multiplication végétative en pots ou boîtes. Les bourgeons les plus développés sont alors mis en enracinement sur MS + ANA 1 mg/l (ANA : acide naphthalène-acétique). Les racines apparaissent de 2 à 6 semaines après.

Dès que les racines sont suffisamment développées, les plantes sont acclimatées en serre dans du terreau universel. Au bout de 3 mois, les plantes sont bien développées (voir photo) et ont perdu la plupart des variations phénotypiques dues à la culture in vitro.

#### EXEMPLE 15 : EXPRESSION DE LA PROTEINE DE CAPSIDE ET DE LA PROTEINE CHIMERIQUE DERIVEE DANS LES BETTERAVES TRANSGENIQUES

Bien que sachant les betteraves transgéniques, grâce aux tests de détection du gène codant pour la  $\beta$ -glucuronidase, il n'était pas certain que le gène



intéressant, à savoir celui codant pour les protéines de capsid du BNYVV, était bien exprimé dans ces plantes. Pour le savoir, il faut détecter ces protéines dans les tissus de betterave transformées. Pour détecter les protéines dans les transformants, il a été fait appel à la technique de Western blot (Ausubel et al, 1987). Celle-ci consiste à faire migrer les protéines solubles extraites de broyat de tissus des transformants, sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970). Les protéines ainsi séparées sont transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane est ensuite hybridée avec des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre le BNYVV. La révélation se fait par addition d'anticorps anti-lapin conjugués à la phosphatase alcaline, qui utilise des substrats chromogènes. La figure 11 montre le type de résultats obtenus. Les extraits de betterave transgéniques contenant le gène codant pour les protéines de capsid montrent une bande immunoréactive migrant au même niveau que la protéine de capsid du virus. Cette bande n'est pas présente dans les extraits de plante non transformées. De plus, dans les extraits de plantes transformées, on détecte une bande à 29 Kd correspondant à la protéine chimérique dérivée de la 22 Kd par addition de 64 acides aminés, due au "readthrough" (exemple 5). Ces deux protéines de 22 et 29 Kd n'ont pu être détectées que dans des extraits de racines de transformants et pas dans les feuilles. La figure 11 illustre donc l'expression spécifique, dans les racines de betteraves transgéniques, des protéines de 22kD et de 29kD, malgré l'utilisation d'un promoteur constitutif. La fonctionnalité du promoteur dans les parties aériennes de la plante est confirmée





par l'expression du gène marqueur GUS dans tous les tissus.

Le BNYVV se transmet et se développe au niveau des racines, il est donc avantageux que les protéines susceptibles d'inhiber le virus soient présentes dans ces organes.

**EXEMPLE 16 : OBTENTION DE GRAINES DE BETTERAVES TRANSGENIQUES**

Après 2 à 3 mois d'acclimatation en serre des plantes transgéniques, il a été constaté qu'elles étaient phénotypiquement conformes à la plante mère. A ce stade les plantes possèdent de 10 à 15 feuilles très bien développées, et sont toujours à l'état de rosette. Pour savoir si les plantes obtenues sont tout à fait normales et notamment fertiles, et si le gène introduit est transmis à la descendance, les plantes ont été vernalisées pour induire la montée à graine. Les transformants primaires sont donc placés entre 2 et 7°C à l'obscurité pendant 3 mois, puis en champs en période de jour long. Un mois à un mois et demi après la mise en champ, la hampe florale commence à monter.

La floraison a lieu trois mois environ après la sortie de vernalisation, et les fruits sont mûrs deux mois après.

Quand les glomérules sont bien secs, ils sont récoltés et nettoyés. Les graines sont ainsi prêtes à être semées.

**EXEMPLE 17 : APPLICATION DE LA METHODE DE L'INVENTION A DIFFERENTES VARIETES DE BETA VULGARIS :**

Les méthodes de transformation et de régénération décrites dans les exemples 9 à 14 ont été appliquées à des suspensions cellulaires et à des dispersions de cals blancs friables issues de plantes provenant d'une variété "élite" (variété parente d'hybrides commerciaux).



Des plantes transgéniques exprimant la protéine de capsid du BNYVV ont été obtenues. Cette expression était spécifique dans les racines. La variété "élite" ayant un environnement génétique différent des autres variétés transformées, l'expression spécifique semble être alors conservée dans l'espèce Beta vulgaris.

La reproductibilité de ces techniques a été vérifiée en appliquant les méthodes de transformation et de régénération de l'invention à d'autres variétés et en d'autres sites géographiques par une autre équipe d'expérimentateurs. Dans chaque cas, des plantes transgéniques ont été obtenues.

**EXEMPLE 18 : AUTOFECONDATIONS ET CROISEMENTS DES PLANTES TRANSGENIQUES RESISTANTES A LA RHIZOMANIE**

Des graines transgéniques ont été obtenues à la fois sur des autofécondations des plantes transformées et sur des croisements de ces mêmes plantes avec trois autres lignées de betteraves mâles stériles (une lignée mâle stérile génique monogerme, une lignée mâle stérile génique multigerme et une lignée mâle stérile cytoplasmique).

L'expression spécifique de la protéine de capsid et de celle de la protéine de 29kD dans les racines de toutes les plantes transgéniques issues d'autofécondations et de croisements a été obtenue.

Ces résultats attestent que cette expression spécifique est maintenue dans un environnement génétique différent de celui des transformants primaires.



## BIBLIOGRAPHIE

- ABEL P.P., NELSON R.S., DE B., HOFFMANN N., ROGERS S.G., FRALEY R.T., BEACHY R.N. (1986) - Science 232 : 738-743.
- AKIYOSHI D.E., MORRIS R.O., HINZ R., MISCHKE B.S.; KOSUGE T., GARFINKEL D.J., GORDON M.P., NESTER E.W. (1983) - PNAS 80 : 407-411.
- AN G. (1985) - Plant Physiol. 79 : 568-570.
- AN G., WATSON B.D., STACHEL S., GORDON M.P., NESTER E.W. (1985) - EMBO J. 4 : 277-284.
- AN G. (1986) - Plant Physiol. 81 : 86-91.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGTON R.E., MOORE D.D., SMITH J.A., SEIDMAN J.G. and STRUHL K. (1987) - Current Protocol in Molecular Biology - Published by Green Publishing Associates and Wiley Interscience.
- BEVAN M., FLAVELL R.B., CHILTON M.D. (1983) - Nature 304 : 184-187.
- BEDBROOK J.R., CHALEFF R.S., FALCO S.C., MAZUR B.J., YADAV N.S., (1988) - EP-A-0257993
- BEVAN M. (1984) - Nucl. ac. Res. 12 : 8711-8721.
- BOLIVAR F.; RODRIGUEZ R.L., GREEN P.I., BETLACH M.C., HEYNECKER H.L., BOYER H.W., CROSA J.H., FALKOW S. (1977) - Gene 2 : 95-113.
- BOLIVAR F., BACKMAN K. (1979) - Methods in Enzymol. 68 : 245-267.
- BOUZOUBAA S., ZIEGLER V., BECK D., GUILLEY H., RICHARDS K., JONARD G. (1986) - J. Gen. Virol. 67 : 1689-1700.
- BROADBENT L. (1976) - Ann. Rev. Phytopathol. 14 : 75.
- CUOZZO M., O'CONNEL K.M., KANIEWSKI W., FANG R.X., CHUA N.H. and TUMER N.E. (1988) - Biotechnology 6 : 549-557.
- DALE P.J., MARKS M.S., BROWN M.M., WOOLSTON C.J., GUNN H.V., MULLINEAUX P.M., LEWIS D.M., KEMP J.M., CHEN



- D.F., GILMOUR D.M. and FLAVELL R.B. (1989) - Plant Science 63 : 237-245.
- DE BLOCK M., BOTTERMAN J., VANDEWIELE M., DOCKX J., THOEN C., GOSSELE V., RAO MOVVA N., THOMSON C., VAN MONTAGU M., LEEMANS J., (1987) EMBO J. 6 : n° 9, 2513-18.
- DETREZ C. TETU T., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S. (1988) - J. Exp. of Bot. 39 (204) : 917-926.
- DITTA G., STANFIELD S., CORBIN D., HELINSKI D.R. (1980) - PNAS 77 : 7347-7351.
- FERNOW K.H. (1967) - Phytopathol. 57 : 13-47.
- FISCHOFF D.A., et al (1987), BIO/TECHNOLOGY 5 : 807-813.
- FRANCK A., GUILLEY H., JONARD G., RICHARDS K., HIRTH L. (1980) - Cell 21 : 285-294.
- FREYTAG A.H., ANAND S.C., RAO-ARELLI A.P. and OWENS L.D. (1988) - Plant Cell Reports 7 : 30-34.
- GERLACH W.L., LLEWELLYN D. and HASELOFF J. (1987) - Nature 328 : 802-805.
- GIELEN J.J.L., et al , Abstracts of 7th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. I.A.P.T.C. Juin 1990, Amsterdam.
- GUERCHE P., BELLINI C., LE MOULLEC J.M., CABOCHE M. (1987) - biochimie 69 : 621-628.
- HARRISSON D.B., MAYO M.A. and BAULCOMBE (1987) - Nature 328 : 799-802.
- HARPSTER M.H., TOWNSEND J.A., JONES J.D.J., BEDBROOK J., DUNSMUIR P. (1988) - Mol. Gen. Genet. 212 : 182-190.
- HOEKEMA A., HIRSCH P.R., HOYKAAS P.J.J. and SCHILLPEROOT R.A. (1983) - Nature 303 : 179-180.
- HOOD E.E., HELMER G.L., FRALEY R.T., CHILTON M.D. (1986) - J. Bact. 168 : 1291-1301.
- JEFFERSON R.A., KAVANAGH T.A. and BEVAN M.W. (1987) - EMBO J. 6 : 3901-3907.





- KRENS F.A., ZIJLSTRA C., VAN DEN MOLEN W., JAMAR D. and HUIZING H.J. (1988) - *Euphytica* S. 185 : 194.
- LAEMMLI V. (1970) - *Nature* 277 : 680-685.
- LEWELLEN R.T., SKOYEN I.O. and ERICHSEN A.W. (1987) - in 50th Winter Congress I.I.R.B. Bruxelles 11-12 February 1987, 136-156.
- LINDSEY K. and JONES M.G.K. (1989) - *Plant Cell Reports* 8(2) : 71-74.
- LOESH-FRIES L.S., MERLO D., ZIMMENT T., BURHOP L., HILL K., KROHN K., JARNIS N., NELSON S., HALK E. (1987) - *EMBO J.* 6 : 1845-1851.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982) - *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- MARIANI C., et al (1990), *NATURE*, vol. 347 : 737-741.
- MAULE A.J., BOULTON M.I., WOOD K.R. (1980) - *Phytopath Z.* 97 : 118-126.
- MAXAM A.M. and GILBERT W. (1980) - *Methods Enzymol.*, 65 : 499-560.
- MESSING J. (1983) - in *methods in Enzymology* 101 : 20-78 Academic Press, New York.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) - *Plant Physiol* 15 : 473-497.
- PERLAK J., et al, (1990) *BIO/TECHNOLOGY*, vol. 8, 939-943.
- PUTZ C. (1977) - *J. Gen. Virol.* 35 : 397-401.
- PUTZ C., RICHARD-MOLARD M. (1984) - *C.R. Acad. Agr. de France* 70 : 370-378.
- RICHARDS K., JONARD G., GUILLEY H., ZIEGLER V. and PUTZ C. (1985) - *J. Gen. Virol.* 66 : 345-350.
- RITCHIE G.A., SHORT K.C., DAVEY M.R. (1989) - *J. Exp. Bot.* 40(211) : 277-283.
- ROTHSTEIN S.J., JORGENSEN R.A., YIN J.C.P., YONG-DI Z., JOHNSON R.C., REZNIKOFF W.S. (1980) - *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 45 : 99-106.



- SALLE G., LE GOZ S. and TOQUET C. (1986) - *Physiol. Veg.* 24 : 73-83.
- SAMAC D.A., NELSON S.E., LOESCH-FRIES L.S. (1983) - *Virology* 131 : 455-462.
- SANDERS P.R., WINTER J.A., BARNASSON A.R., ROGERS S.G., FRALEY R.T. (1987) - *Nucl. Acid Res.* 15 : 1543-1548.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977) - *PNAS* 74 : 5463-5467.
- SAUNDERS J.W. and DOLEY W.P. (1986) - *J. Plant. Physiol.* 124 : 473-479.
- SCOTT R.J. and DRAPER J. (1987) - *Plant Mol. Biol.* 8 : 264-274.
- TAMADA T. and BABA T. (1973) - *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 39 : 325-332.
- TETU T., SANGWAN R.S. and SANGWANN-NORREEL B.S. (1988) - *J. Exp. Bot.* 38 (188) : 506-517.
- TUMER N.E., O'CONNEL K.H., NELSON R.S., BEACHY R.N., FRALEY R.T., SHAH D.H. (1987) - *EMBO J.* 6 : 1181-1188.
- TWIGG A.J. and SHERATT D. (1980) - *Nature* 283 : 216-218.
- VAECK M, et al (1987), *NATURE*, 328, 33-37.
- VAN DER WERF S., BREGEGERE F., KOPECKA H., KITAMURA N., ROTHBERG P.G., KOURILOSKY P., WIMMER E., GIRARD M. (1981) - *PNAS* 78 / 5983-5987.
- VAN DUM M.P., BOL J., VAN VLOTEN-DOTING L. (1987) - *Virology* 159 : 299-305.
- VIEIRA J., MESSING J. (1982) - *Gene* 19 : 259-268.
- WATTS J.W., KING J.M., STACEY N.J. (1987) - *Virology* 157 : 40-46.
- WIDHOLM J.M. (1972) - *Stain Tech.* 47 : 189-194.
- YACoub A. and TEPPER D. (1987) - in 50th Winter Congress I.I.R.B. Bruxelles 11-12 February 1987, 107-308.



61

ZIEGLER V., RICHARDS K., GUILLEY H., JONARD G., PUTZ  
C. (1985) - J. Gen. Virol. 66 : 2079-2087.



REVENDECATIONS

1. Procédé de transformation de cellules végétales appartenant à l'espèce Beta vulgaris caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'une dispersion de cals blancs friables dans un milieu de culture cellulaire végétale liquide contenant 0 à environ  $3.0 \text{ mgL}^{-1}$  d'une cytokine, ou d'une suspension de cals blancs friables dans un milieu de culture cellulaire végétale liquide contenant environ 0.1 à environ  $3.0 \text{ mgL}^{-1}$  d'une cytokinine, avec Agrobacterium contenant un vecteur portant un gène destiné à être introduit dans les cellules végétales, suivie de coculture des cellules végétales et des bactéries pour donner lieu à des cals friables transformés.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

- I) induction de cals blancs friables à partir d'explant ;
- II) dispersion des cals dans un milieu de culture cellulaire végétale liquide contenant 0 à environ  $3.0 \text{ mgL}^{-1}$  d'une cytokinine, ou obtention d'une suspension cellulaire à partir des cals dans un milieu de culture cellulaire végétale liquide contenant environ 0.1 à environ  $3.0 \text{ mgL}^{-1}$  d'une cytokinine ;
- III) mise en contact de la dispersion ou de la suspension cellulaire, avec Agrobacterium tumefaciens contenant un vecteur portant un gène destiné à être introduit dans les cellules végétales, suivie de coculture des cellules végétales et des bactéries ;
- IV) lavage des cellules végétales pour éliminer les bactéries et sélection des cellules transformées sur un milieu sélectif ;





V) culture des cellules transformées sélectionnées pour obtenir des cals friables transformés.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les cals blancs friables sont induits à partir de jeunes feuilles, ayant par exemple une longueur de 3 à 5 cm, prélevées d'une plante âgée de moins de trois mois.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la dispersion des cals s'effectue dans un milieu de culture cellulaire végétale contenant de la 6-benzylaminopurine (BAP), plus particulièrement environ  $1\text{mg l}^{-1}$  BAP.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la suspension cellulaire est obtenue par mise en culture pendant 2 à 3 semaines des cals blancs friables âgés de 4 à 6 semaines dans le milieu de culture additionné de cytokinine, le milieu étant agité pendant cette période, suivie de repiquage de la suspension ainsi obtenue sur du milieu de culture frais, donnant lieu à deux types cellulaires, notamment type habitué et type noduleux.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le milieu de culture est additionné de la 6-benzylaminopurine (BAP), plus particulièrement environ  $1\text{mg l}^{-1}$  BAP.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le milieu de culture cellulaire végétale est le milieu de Murashige et Skoog (1962), dit milieu M.S.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la coculture de cellules végétales et des bactéries s'effectue pendant 3 jours dans l'obscurité sur un



milieu de culture cellulaire végétale tel que le milieu MS, éventuellement additionné de cytokinine, par exemple environ 1 mg l<sup>-1</sup> BAP.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'élimination des bactéries s'effectue par lavage des cellules végétales avec un milieu de culture cellulaire végétale contenant un agent bactériostatique inhibant la croissance d'Agrobacterium, par exemple le céfotaxime.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la sélection des cellules transformées s'effectue sur un milieu contenant de la kanamycine.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la culture des cellules transformées sélectionnées s'effectue sur un milieu de culture solide, tel que le milieu M.S solide, additionné de cytokinine, d'agent bactériostatique et d'agent sélectif.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 caractérisée en ce que le gène destiné à être introduit dans les cellules végétales est choisi parmi un gène conférant un caractère d'intérêt agronomique ou industriel, par exemple un gène de résistance à l'infection par un virus, tel qu'un gène codant pour la protéine de capsid du virus BWYV ou du virus BNYVV, un gène conférant une résistance à un herbicide ou à un insecticide, ou encore un gène dont l'expression confère la stérilité mâle

13. Procédé de régénération de bourgeons et/ou d'embryons transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris à partir d'explants, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :



I) obtention de cals friables transformés selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 ;

II) repiquage des cals transformés sur un milieu de culture contenant 0 à environ 3  $\text{mg l}^{-1}$  d'une cytokinine, et éventuellement un agent bactériostatique et un agent sélectif jusqu'à l'apparition de bourgeons et/ou d'embryons transgéniques.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le milieu de culture est le milieu M.S additionné d'environ 1  $\text{mg l}^{-1}$  BAP et éventuellement environ 300  $\text{mg l}^{-1}$  cétotaxime et 200  $\text{mg l}^{-1}$  kanamycine.

15. Procédé de régénération de plantes transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

I) régénération de bourgeons et/ou d'embryons transgéniques selon le procédé de la revendication 13 ;

II) repiquage des bourgeons et/ou des embryons transgéniques sur un milieu de culture tel que le milieu M.S additionné d'environ 0.1  $\text{mg l}^{-1}$  cytokinine, par exemple de la BAP ;

III) remise des structures régénérées en multiplication végétative suivi d'enracinement sur un milieu de culture tel que le milieu M.S contenant de l'acide naphthalène acétique, par exemple environ 1  $\text{mg l}^{-1}$ .

16. Procédé de production de graines de plantes transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

I) régénération de plantes transgéniques selon le procédé de la revendication 15 ;



II) vernalisation des plantes transgéniques et récolte des graines après floraison.

17. Cals friables transformés appartenant à l'espèce Beta vulgaris et pouvant être produits selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

18. Bourgeons et/ou embryons transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris et pouvant être produits selon l'une des revendications 13 et 14.

19. Plantes transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris et pouvant être produits selon le procédé de la revendication 15.

20. Graines de plantes transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris et pouvant être produits selon la revendication 16.

21. Plante transgénique appartenant à l'espèce Beta vulgaris et résistante à l'infection par le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave à sucre (BNYVV), ladite plante étant transformée d'une manière stable par un fragment d'acide nucléique, dont le produit d'expression est capable de conférer ladite résistance, ledit fragment étant dérivé de l'extrémité 5' de l'ARN2 génomique ou subgénomique du BNYVV, ou du CADN correspondant, ce fragment codant pour au moins une partie des protéines codées par les nucléotides 145 à 3285 de la séquence sauvage de l'ARN2, et étant sous le contrôle d'un promoteur permettant l'expression du fragment dans les cellules de la plante et étant dans l'orientation sens ou antisens.

22. Plante transgénique, selon la revendication 21, dans laquelle ledit fragment code pour au moins une partie de la protéine codée par les nucléotides 145 à 2218 de l'ARN2 ou pour une variante de cette protéine présentant une homologie d'au moins 80 % et comportant l'insertion, la substitution ou la délétion d'acide(s) aminé(s).





23. Plante transgénique, selon la revendication 22, dans laquelle ledit fragment code pour la protéine codée par les nucléotides 145 à 708 et, en outre, pour une partie de la protéine codée par les nucléotides 709 à 2218 de l'ARN2 du BNYVV.

24. Plante transgénique, selon la revendication 23, dans laquelle ledit fragment code pour la protéine codée par les nucléotides 145 à 871 de l'ARN2 du BNYVV.

25. Plante transgénique, selon la revendication 24, dans laquelle ledit fragment est composé par les nucléotides 91 à 871 de l'ARN2 du BNYVV.

26. Plante transgénique, selon la revendication 22, dans laquelle ledit fragment code pour au moins une partie d'une variante de la protéine codée par les nucléotides 145 à 2218, ladite variante se distinguant de la séquence sauvage par la présence de la séquence Glu Asp Leu Pro qui remplace les acides aminés His ALa codés par les nucléotides 253 à 258 de la séquence sauvage.

27. Plante transgénique selon la revendication 26, dans laquelle ledit fragment code pour une partie de la variante et est composé par les nucléotides 91 à 871 de la séquence sauvage, les nucléotides 253 à 258 de la séquence sauvage étant remplacés par ceux codant pour Glu Asp Leu Pro.

28. Plante transgénique, selon la revendication 26, dans laquelle ledit fragment code pour une partie de la variante, ladite partie correspondant à celle codée par les nucléotides 145 à 255 dans la séquence sauvage, les nucléotides 253 à 255 de la séquence sauvage étant remplacés par ceux codant pour Glu.

29. Plante transgénique, selon la revendication 26, dans laquelle ledit fragment code pour une partie de la variante, ladite partie correspondant à celle



codée par les nucléotides 256 à 871 dans la séquence sauvage, les nucléotides 256 à 258 de la séquence sauvage étant remplacés par ceux codant pour Asp Leu Pro.

30. Plante transgénique, selon la revendication 22, dans laquelle ledit fragment code pour au moins une partie d'une variante de la protéine codée par les nucléotides 145 à 2218, ladite variante se distinguant de la séquence sauvage par la présence de la séquence Arg Ser Ser Gly au lieu des acides aminés codés par les nucléotides 637 à 651 de la séquence sauvage, la séquence Arg Ser Ser Gly formant le carboxy-terminal de la protéine.

31. Plante transgénique, selon la revendication 30, dans laquelle ledit fragment code pour une partie de la variante et est composé par les nucléotides 91 à 871 de la séquence sauvage, les nucléotides 637 à 654 de la séquence sauvage étant remplacés par ceux codant pour Arg Ser Ser Gly stop.

32. Plante transgénique, selon la revendication 31, dans laquelle ledit fragment code pour une partie de la variante, ladite partie correspondant à celle codée par les nucléotides 144 à 640 de la séquence sauvage.

33. Plante transgénique, selon la revendication 31, dans laquelle ledit fragment code pour une partie de la variante et est composé par les nucléotides 641 à 871 de la séquence sauvage, les nucléotides 641 et 642 de la séquence sauvage étant remplacés par GA et les nucléotides 643 à 654 étant remplacés par ceux codant pour Ser Ser Gly Stop.

34. Plante transgénique, selon la revendication 21 comprenant un fragment de l'extrémité 5' de l'ARN2 subgénomique du BNYVV, ou du CADN correspondant, ledit fragment codant pour au moins une partie de la



protéine codée par les nucléotides 2133 à 3285 de l'ARN2, ou pour une variante de cette protéine présentant au moins 80 % d'homologie et comportant l'insertion, la substitution ou la délétion d'acide(s) aminé(s).

35. Plante transgénique, selon la revendication 34 dans laquelle ledit fragment code pour la protéine codée par les nucléotides 2133 à 2774 de l'ARN2 du BNYVV.

36. Plante transgénique, selon la revendication 35 dans laquelle ledit fragment est composé par les nucléotides 2078 à 2774 de l'ARN2 du BNYVV.

37. Plante transgénique, selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle exprime la protéine conférant la résistance, et codée par ledit fragment, uniquement dans les racines.

38. Plante transgénique, selon la revendication 37, caractérisée en ce que le promoteur contrôlant l'expression de ladite protéine est un promoteur constitutif, par exemple le pNos ou le p35S.

39. Plante transgénique selon la revendication 37, susceptible d'être obtenue par le procédé de la revendication 15.

40. Graines de plantes transgéniques selon l'une quelconque des revendications 21 à 39.

41. Procédé de production de plantes transgéniques appartenant à l'espèce Beta vulgaris et résistante à l'infection par le BNYVV, ladite plante exprimant, spécifiquement dans les racines, une protéine capable de conférer ladite résistance, ledit procédé comprenant la transformation, par l'intermédiaire d'Agrobacterium tumefaciens, de cellules provenant de Beta vulgaris avec un des fragments d'acide nucléique tels que décrits dans



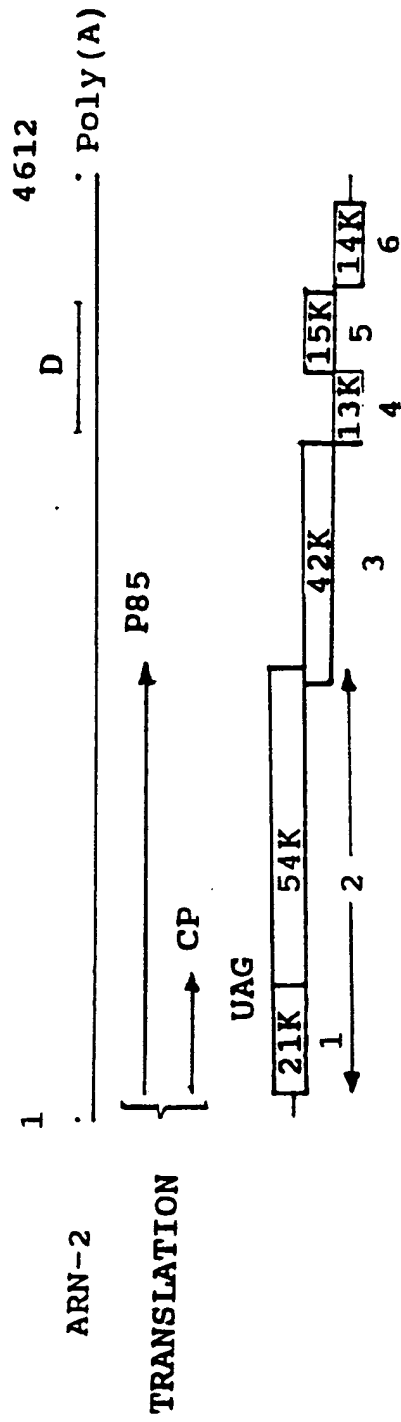
l'une quelconque des revendications 1 à 16, la transcription dudit fragment étant sous le contrôle d'un promoteur constitutif tel que le p35S ou le pNos, suivi de la régénération d'une plante transgénique à partir des cellules transformées.





1/13

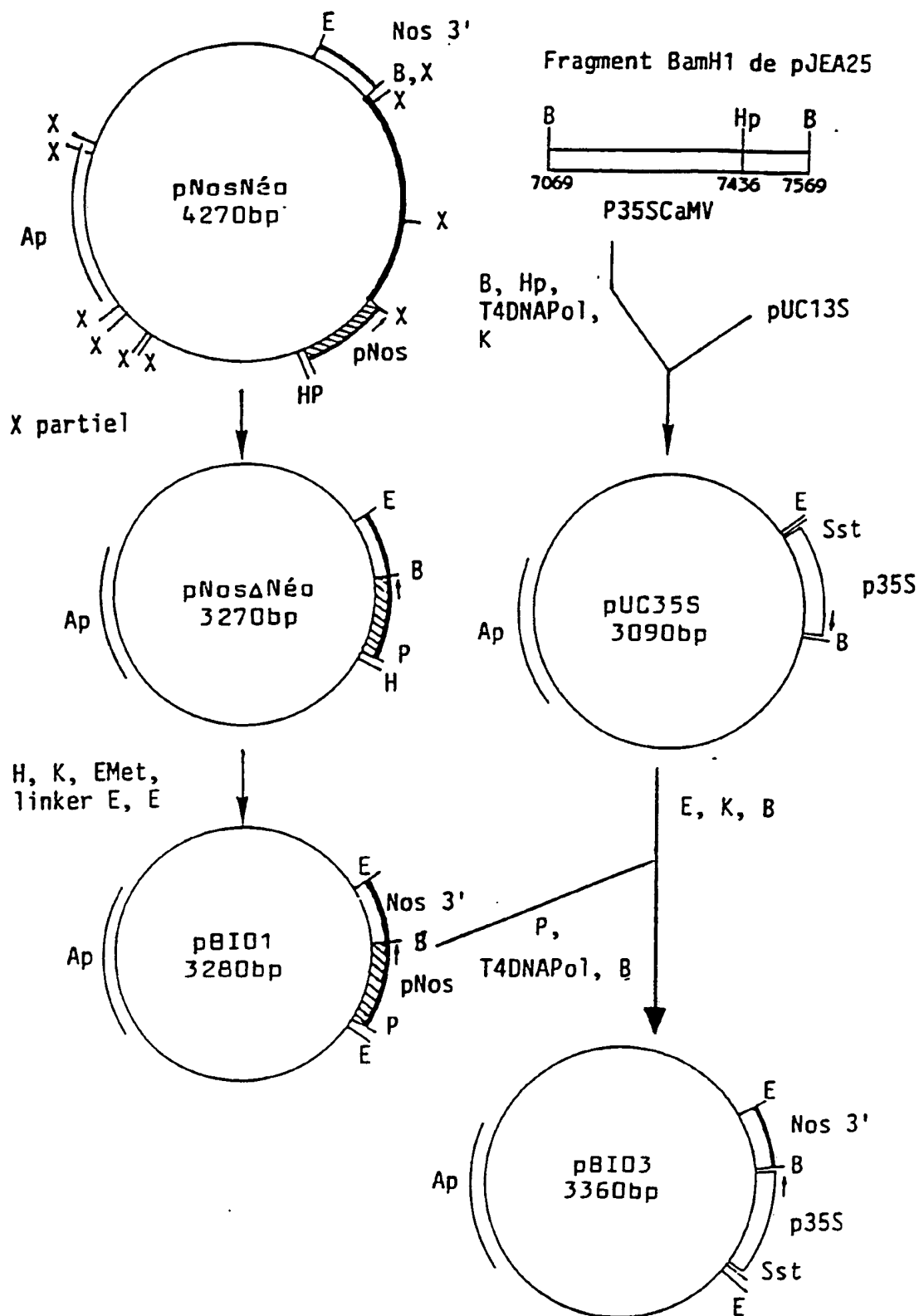
FIGURE 1





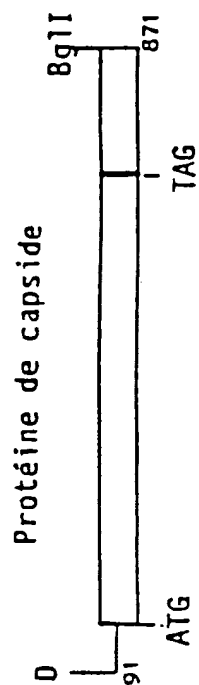
2/13

FIGURE 2

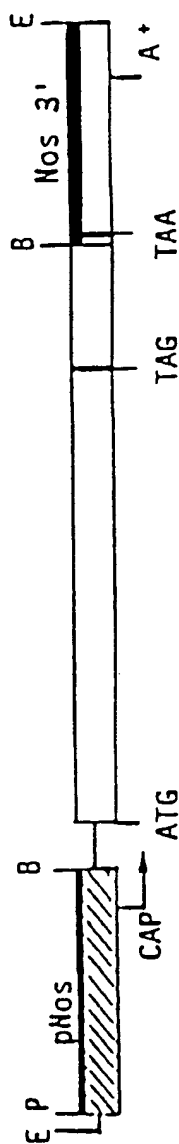




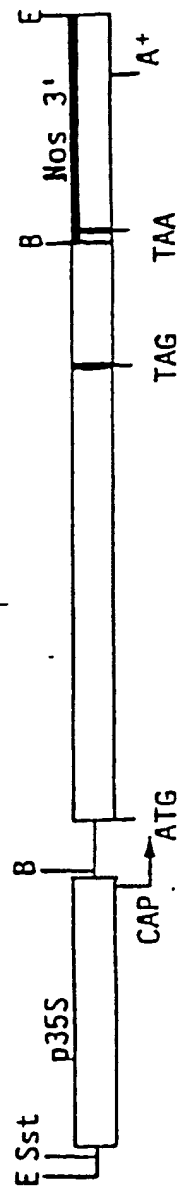
3/13  
**FIGURE 3**



T4 DNA Pol, linkers BamHI  
+ pBIOS 1 BamHI  
ou  
pBIOS 3 BamHI

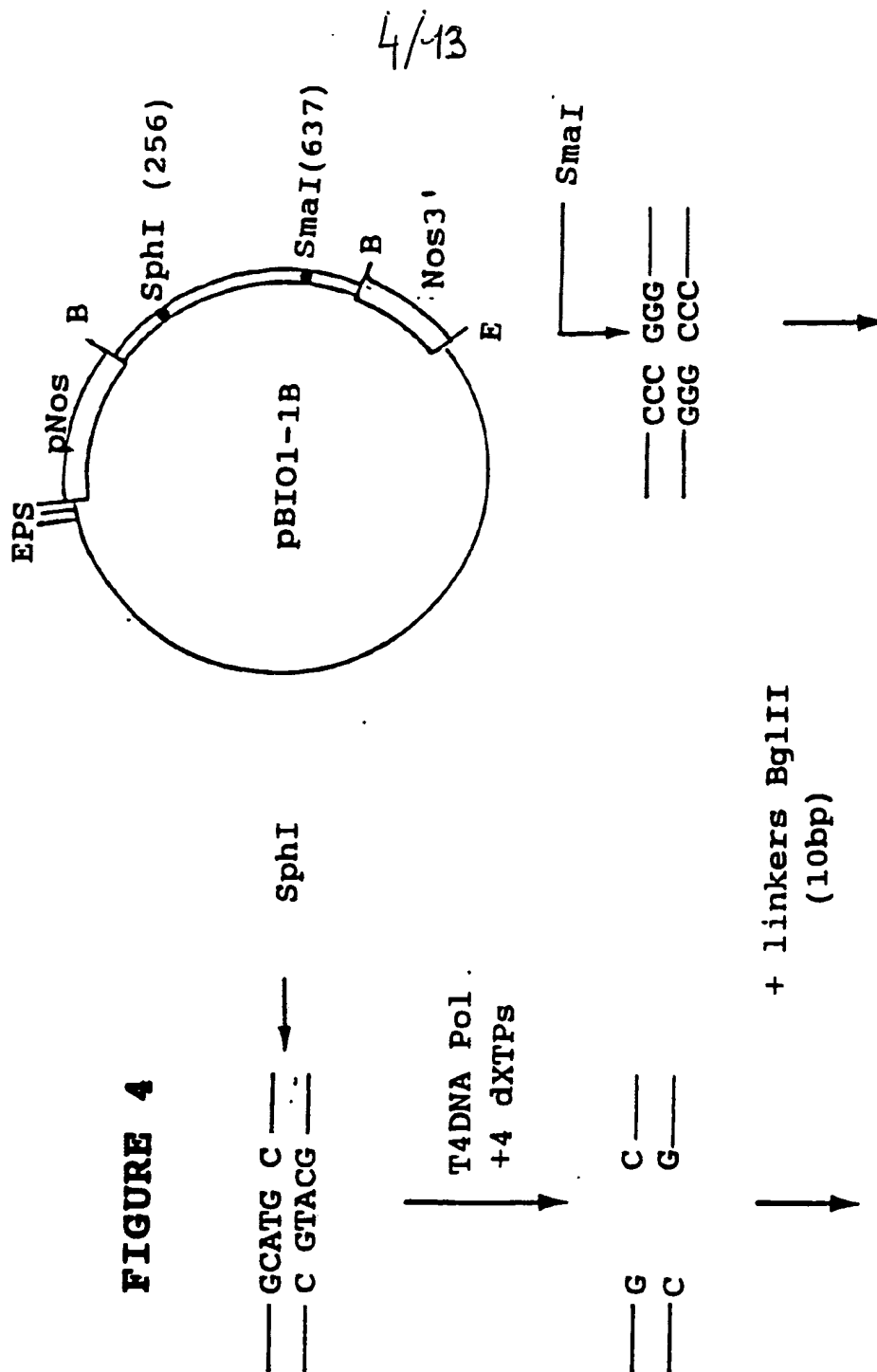


pBIOS 1-1B



pBIOS 1-1B



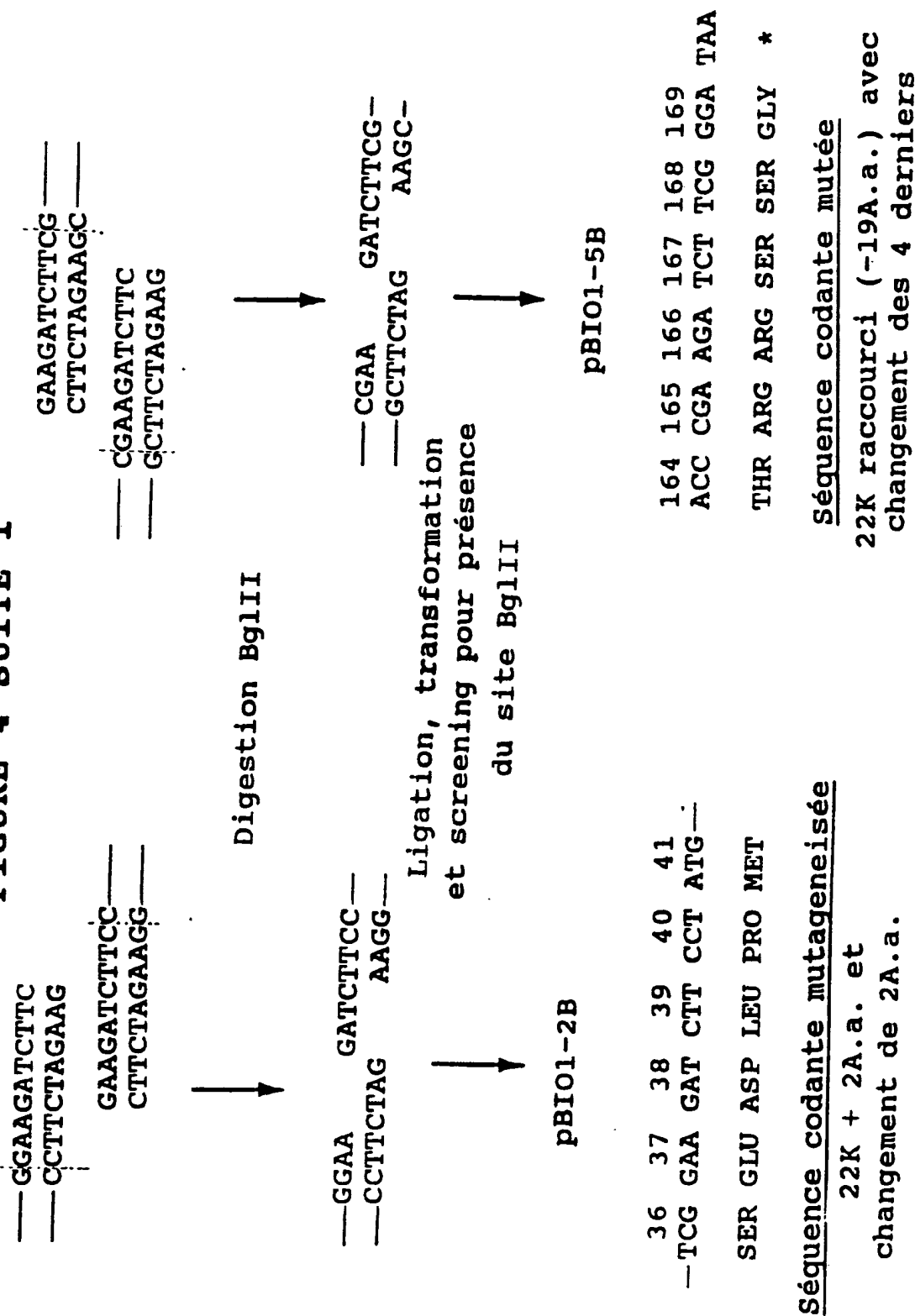






5/13

FIGURE 4 SUIITE 1





## FIGURE 4 SUITE 2

36 37 38 39  
— TCG CAT GCT ATG —

SER HIS ALA MET

164 165 166 167 168 169 170  
— ACC CGG GAT AAA TTT GAG GAC —

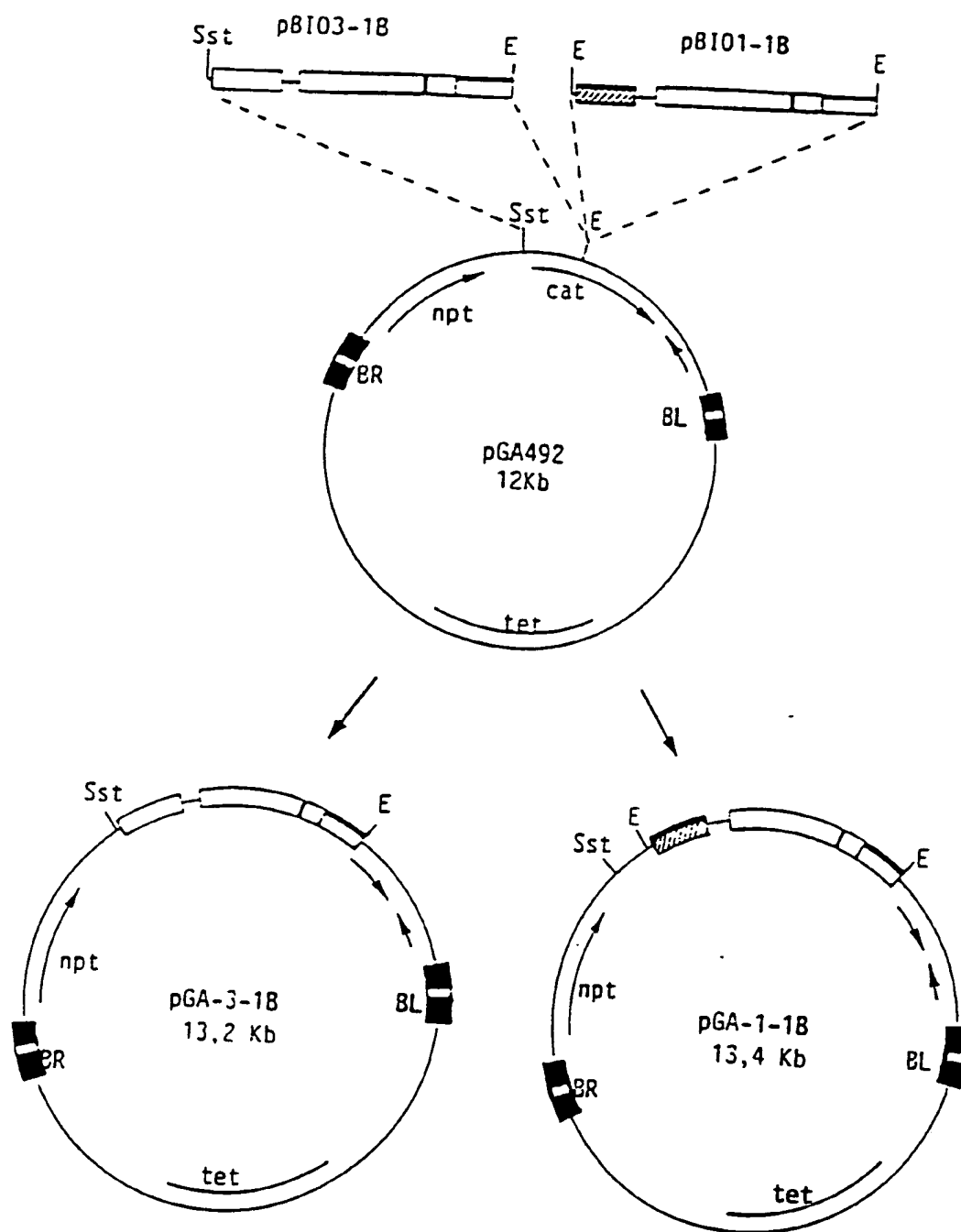
THR ARG ASP LYS PHE GLU ASP

6/43

22K Wild Type

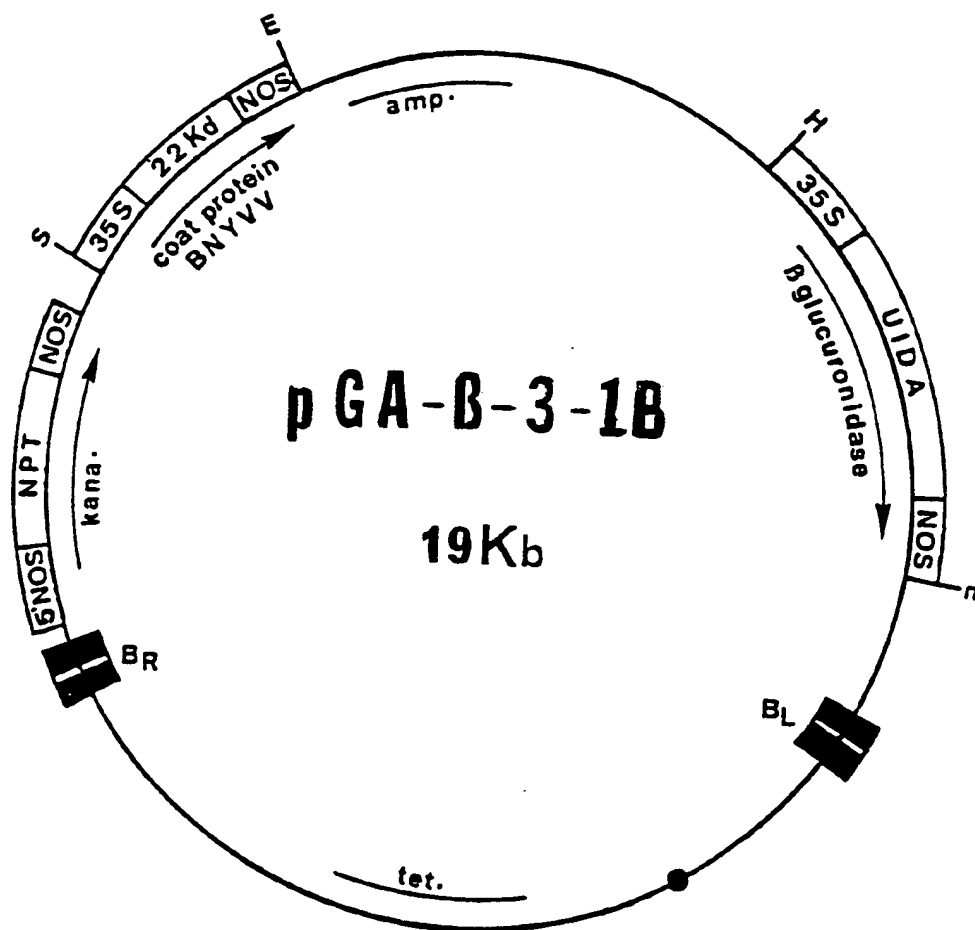


7/13  
**FIGURE 5**





8/13  
**FIGURE 6**

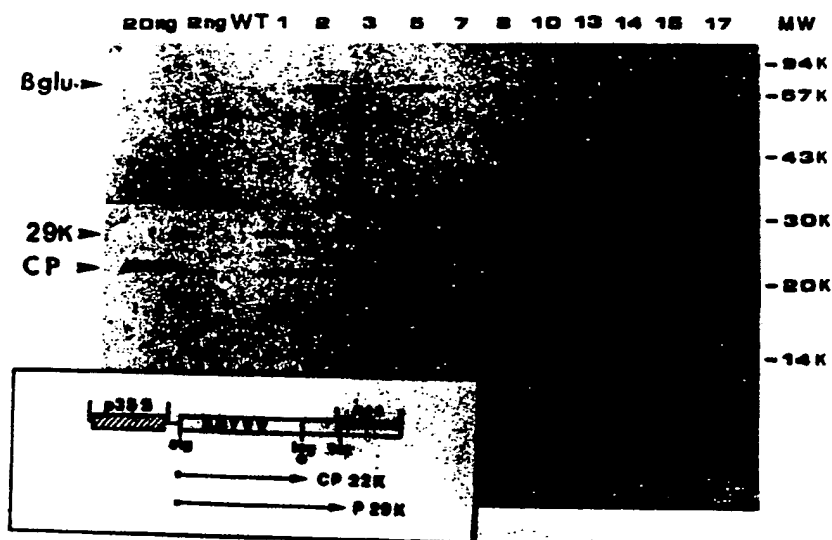






9/13

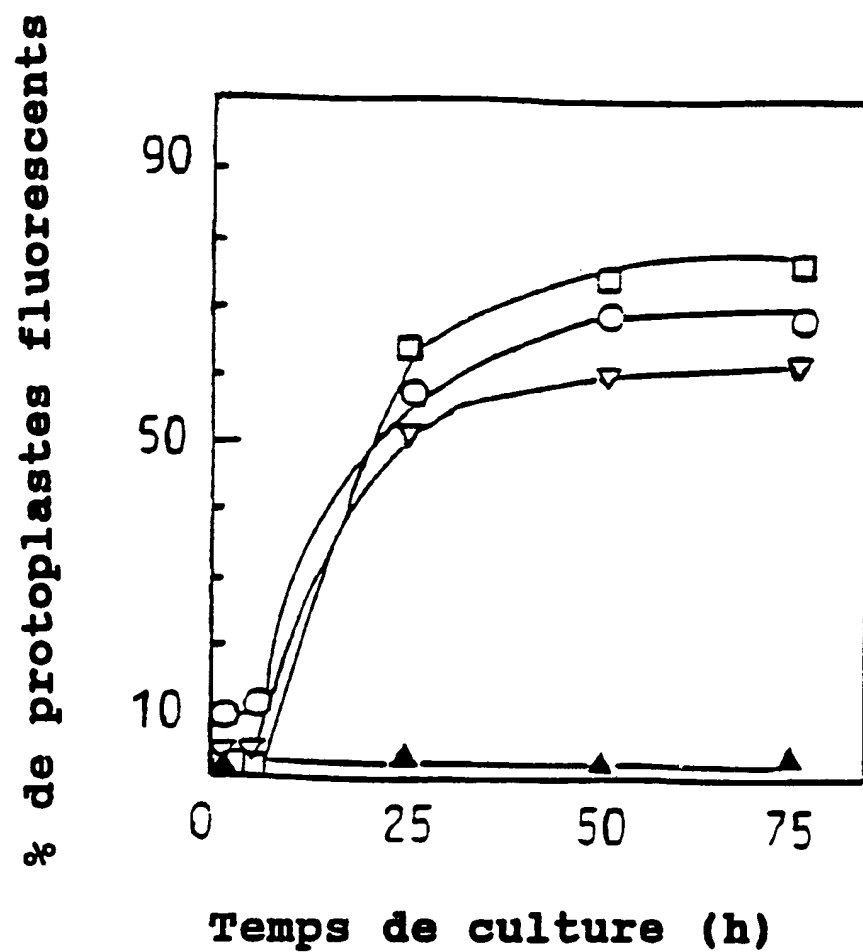
FIGURE 7





10/13

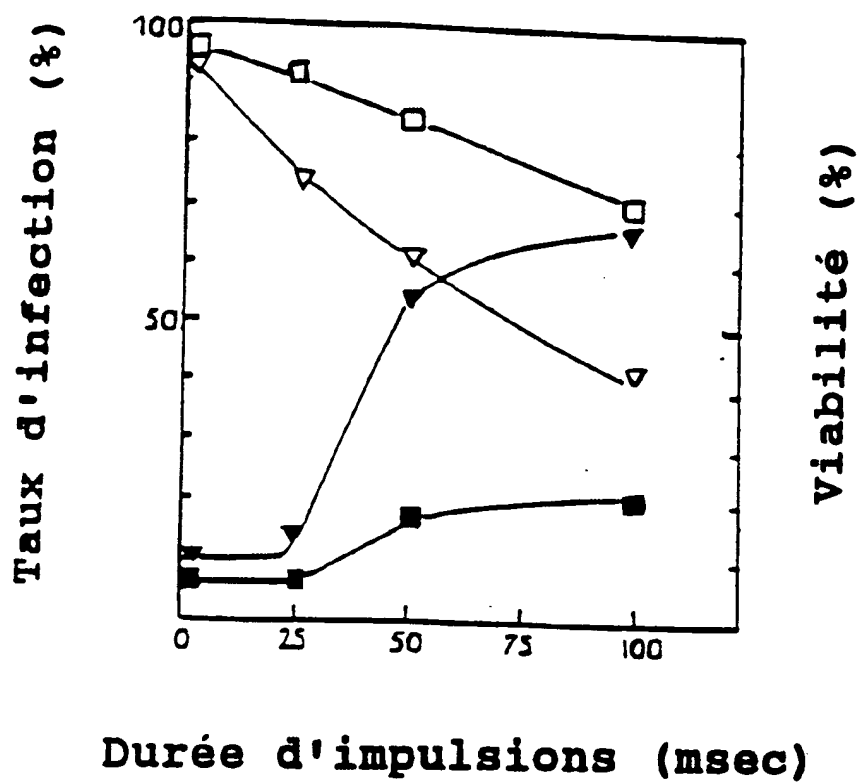
FIGURE 8





11/13

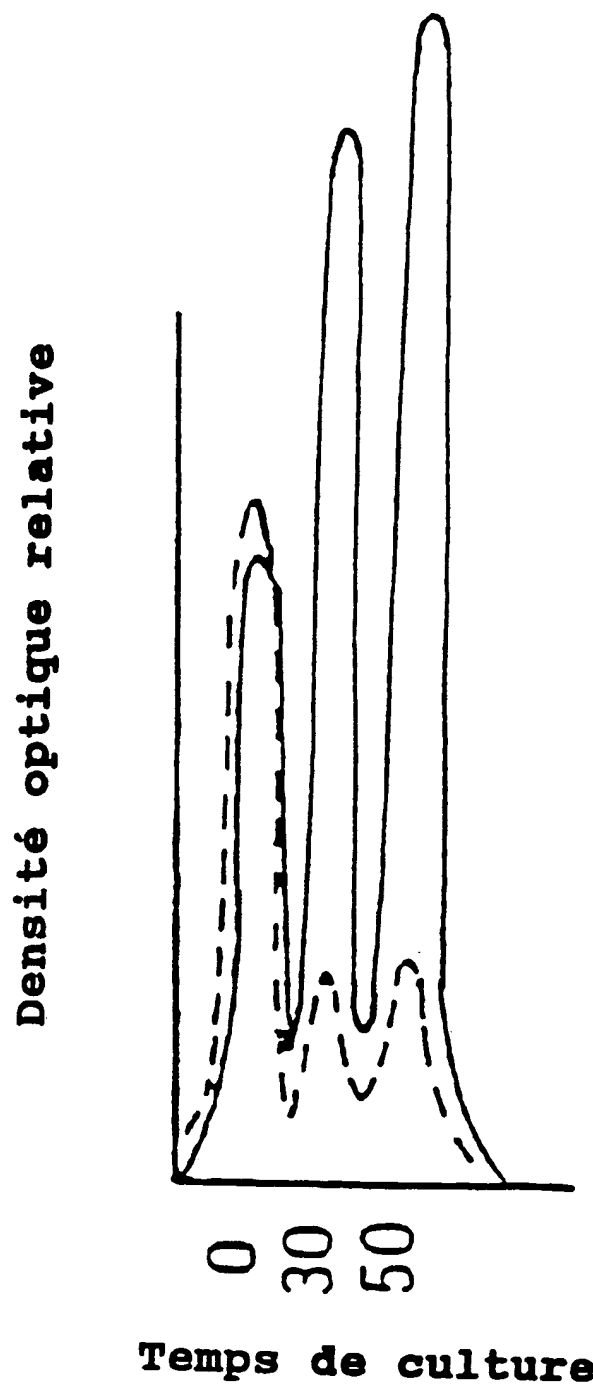
FIGURE 9





12/43

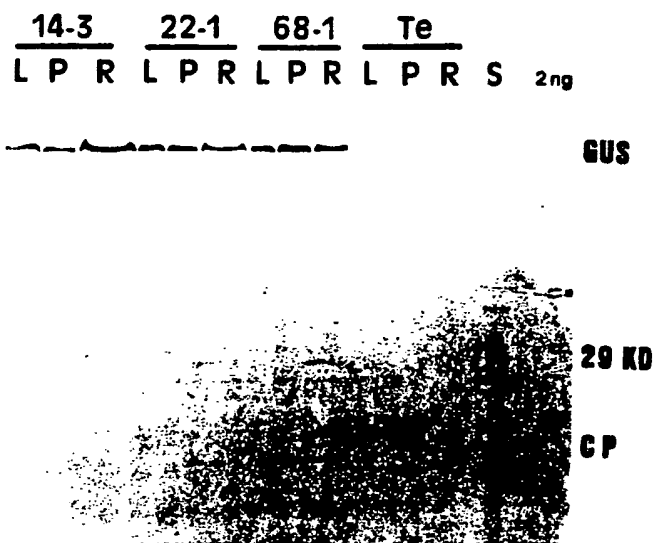
FIGURE 10







13/13  
FIGURE 11





RECEIVED  
ART 34 ADUTCLAIMS

1. Method for inducing resistance to a group I virus comprising a TGB2 sequence into a plant cell or a plant, comprising the following steps:

- 5 - preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide sequence corresponding to at least 70% of the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant,
- 10 - transforming a plant cell with the nucleotide construct, and possibly
- regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell.

2. Method according to the claim 1, characterized in that the nucleotide sequence of the nucleotide construct corresponds to at least 80%, preferably at least 90%, of the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA.

3. Method according to the claim 1 or 2, characterized in that the group I virus is selected from the group consisting of hordéiviruses, benyviruses, pecluviruses and pomoviruses, preferably selected from the group consisting of the beet necrotic yellow vein virus, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

4. Method according to any of the preceding claims, characterized in that the plant cell is a stomatal cell.

5. Method according to any of the preceding claims, characterized in that the plant is selected from the group consisting of sugar beet, potato, barley or peanut.

6. Method according to claim 1 or 2, characterized in that the virus is BNYVV, the nucleotide sequence of TGB2 of said virus is comprised between the



nucleotide 3287 and 3643 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of the BNYVV and the plant is a beet, preferably a sugar beet (*Beta vulgaris*).

7. Method according to any of the preceding  
5 claims, characterized in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence or a terminator sequence active in a plant.

8. Method according to claim 7 characterized  
in that the promoter sequence is a constitutive or a  
10 foreigner promoter sequence.

9. Method according to the preceding claim 7,  
characterized in that the promoter sequence is selected  
from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus  
promoter, and/or the polyubiquitin *Arabidopsis thaliana*  
15 promoter.

10. Method according to any of the claim 7 to  
9, characterized in that the promoter sequence is a  
promoter which is capable of being active mainly into the  
root tissues of plants, such as the par promoter of the  
20 haemoglobin gene from *Perosponia andersonii*.

11. Transgenic plant resistant to a group I  
virus comprising a nucleotide construct having a nucleotide  
sequence corresponding to at least 70% of the nucleotide  
sequence of TGB2 of said virus or its corresponding cDNA,  
25 being operably linked to one or more regulatory sequence(s)  
active in a plant.

12. Transgenic plant according to the claim  
11, characterized in that the nucleotide construct has a  
nucleotide sequence corresponding to at least 80%,  
30 preferably at least 90%, of the nucleotide sequence of TGB2  
of said virus or its complementary cDNA.

13. Transgenic plant according to the claim  
11 or 12, characterized in that the virus is selected from  
the group consisting of hordéiviruses, benyviruses,  
35 pecluviruses and pomoviruses, preferably selected from the



group consisting of the beet necrotic yellow vein virus, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

14. Transgenic plant according to the claims 11 to 13 being a plant selected from the group consisting of sugar beet, potato, barley or peanut.

15. Transgenic plant according to the claims 11 or 12, characterized in that the transgenic plant being a beet, preferably a sugar beet (Beta vulgaris) the virus is BNYVV and the nucleotide sequence of TGB2 of said virus is comprised between the nucleotides 3287 and 3643 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of BNYVV or its corresponding cDNA.

16. Transgenic plant according to any of the preceding claims 11 to 15, characterized in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence and a terminator sequence active in a plant.

17. Transgenic plant according to any of the preceding claims 11 to 16, characterized in that the regulatory sequence(s) comprise a promoter sequence which is a constitutive or a foreigner promoter sequence.

18. Transgenic plant according to the claim 17, characterized in that promoter sequence is selected from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter, and/or the polyubiquitin Arabidopsis thaliana promoter.

19. Transgenic plant according to claim 17 or 18 characterized in that the promoter sequence is a promoter which is capable of being active mainly into root tissues, such as the par promoter of the haemoglobin gene from Perosponia andersonii.

20. Transgenic plant tissue selected from the group consisting of fruit, stem, root, tuber, seed of a plant according to any of the preceding claims 11 to 19.





21. Transgenic plant according to any one of the claims 11 to 19, characterised in that it further carries natural tolerance to Group I viruses.

22. Transgenic plant according to any one of the claims 11 to 19 and 21, characterised in that it further comprises a pesticide, herbicide or fungicide resistance, preferably a resistance selected from the group consisting of nematode resistance, glyphosate resistance, glufosomate resistance and/or acetochloride resistance.



## PCT

WIPO

PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT



(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>P.SES.03/WO</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/EP00/02176</b>	International filing date (day/month/year) <b>07/03/2000</b>	Priority date (day/month/year) <b>12/03/1999</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12N15/40</b>		
Applicant <b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.  
  
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  
  
These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>06/09/2000</b>	Date of completion of this report <b>13.06.2001</b>
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  <b>European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465</b>	Authorized officer  <b>Roscoe, R</b>  Telephone No. <b>+49 89 2399 2554</b> 



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP00/02176

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):
- Description, pages:**

1-16 as originally filed

### Claims, No.:

1-22 as received on 30/05/2001 with letter of 30/05/2001

### Drawings, sheets:

1/2,2/2 as originally filed

### Sequence listing part of the description, pages:

1-3, filed with the letter of 10.10.00

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP00/02176

- ☐ the description,      pages:  
☐ the claims,      Nos.:  
☐ the drawings,      sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

*(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)*

6. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-22
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	

2. Citations and explanations  
**see separate sheet**

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:  
**see separate sheet**

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:  
**see separate sheet**





The documents mentioned in the present International Preliminary Examination Report are numbered as in the search report, i.e. D1 corresponds to the first document of the search report etc.

**V. Reasoned statement on Novelty, Inventive Step and Industrial Applicability**

**- Novelty (Art.33(2) PCT)**

No objections.

**- Inventive Step (Art.33(3) PCT)**

The problem solved by applicant is the provision of a further method of introducing resistance to TGB group I viruses into plants.

The solution is to express mutant (dominant negative) TGB2 proteins of the group I viruses in plant cells.

The solution is considered obvious. D1 and D6 both can be taken as closest prior art. Both documents demonstrate how dominant negative mutants of TGB2 can be used to engineer resistance to TGB-containing plant viruses.

D1 shows that a mutated 13 kDa gene (TGB2) of Potexvirus WCIMV-O provides resistance to systemic infection by WCIMV-O when introduced into *N. benthamiana*. The transgenic plants were further found to be resistant to other Potexviruses and to a Carlavirus. D1 further states in the abstract that virus resistance can be engineered in transgenic plants by expression of dominant negative mutant forms of TGB movement proteins. The examples given are group II viruses, yet no such group distinction is drawn in D1 - on p.10310, col.2 it is stated that TGB proteins have been shown to be essential in Potexviruses / Hordeiviruses (Group I) etc. Conserved features of all these viruses TGB2 genes have been identified - one of which was knocked out in the experimental part of D1 (see beginning of "Results"). There is absolutely no reason to believe that the teaching of D1 could not apply to Group I viruses.



D6 refers back to D1 and performs similar tests using transgenic potato plants expressing PVX TGB2. D6 shows that even distantly-related viruses having movement proteins (MPs) lacking significant sequence similarity can be inhibited by TMV MP. TGB block viruses do however share significant sequence similarity (across groups I and II - even though this distinction is not drawn in D6 (see Fig.1)). D6 clearly distinguishes viruses on the basis of whether they have a TGB or not (see last paragraph). Both group I and II viruses have similar TGB2 genes and thus it is obvious from D6 that teachings relating to the functionality of TGB2 genes in group II viruses also would be reasonably expected to apply to group I viruses.

Hence, the presently claimed subject-matter is entirely obvious in view of either D1 or D6.

- **Industrial Applicability (Art.33(4) PCT)**

The present claims appear to have industrial applicability.

**VII. Certain defects**

The only significant data supplied by applicant appears to be given in Fig.3. However, reading the description, and viewing Fig.3, it is unclear what is meant by D1, A2, A3 etc. It seems from p.9 that A(X) means an alanine substitution. T is clearly identified as w.t. The positions of the mutations are however not identified and thus the data is meaningless. Further, not all mutations appear to result in enhanced resistance, and those that do appear to rarely have a significant effect. Hence, the skilled person is not enabled to make mutations in TGB2 which will achieve resistance without himself experimenting around with various mutants. This is considered undue burden, since he is not taught what characteristics the mutants must have. Hence, subject-matter of claims is considered insufficiently disclosed.

**VIII. Certain observations**

- **Clarity (Art.6 PCT)**



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

---

International application No. PCT/EP00/02176

Claim 1 - "homology" should be replaced by "identity". Same problem applies to claims 2, 11, 12.

Claim 8 - foreign DNA (not "foreigner DNA")

It is noted that the application as a whole is unclearly drafted. Hence, it may be impossible to overcome some of the present objections without introducing unallowable added matter. Should applicant file amendments he should clearly indicate an exact basis therefor.

- **Support in Description (Art.6 PCT)**

Claim 1 is a method of inducing resistance, yet the technical features required to reach this objective are not specified. Of critical importance is the TGB2 sequence. The claim does not define how to obtain dominant negative mutants which are presumably required. The sequence definition encompasses sequences which appear to induce increased susceptibility to group I virus insofar as Fig.3 can be understood i.e. w.t. TGB and other mutants increasing local lesion numbers. Since the claims all lack the essential feature of the "invention", they lack support in the description.



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>7</sup> : <b>C12N</b>	<b>A2</b>	(11) International Publication Number: <b>WO 00/55301</b> (43) International Publication Date: 21 September 2000 (21.09.00)
<p>(21) International Application Number: PCT/EP00/02176</p> <p>(22) International Filing Date: 7 March 2000 (07.03.00)</p> <p>(30) Priority Data: 99200773.2 12 March 1999 (12.03.99) EP</p> <p>(71) Applicant (for all designated States except US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): JONARD, Gérard [FR/FR]; 12, rue du Général Zimmer, F-67084 Strasbourg Cedex (FR). LAUBER, Emmanuelle [FR/FR]; 34, rue de Rotterdam, F-67000 Strasbourg (FR). GUILLEY, Hubert [FR/FR]; 32, rue de l'Herbe, F-67370 Berstett (FR). RICHARDS, Kenneth [FR/FR]; 2a, rue Principale, F-67570 Pfulgriesheim (FR).</p> <p>(74) Agents: VAN MALDEREN, Joëlle et al.; Office Van Malderen, 6/1, place Reine Fabiola, B-1083 Brussels (BE).</p>		<p>(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Published</b> Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR INDUCING VIRAL RESISTANCE INTO A PLANT</p> <p>3287 ATGTCCTAGGCAATAACCGCTCGACCCAATAAGAATGTGCCTATTGTTGTTGGTGTTTGT M S R E I T A R P N K N V P I V V G V C -</p> <p>3347 GTTGIGGCTTTCTTTGTATTGCTGGCGTTCATGCAGCAAAACATAAGACACATTCTGGG V V A F F V L L A F M Q Q K H K T H S G -</p> <p>3407 GGTGATTACGGAGTCCCAACATTTTCTAACGGTGGTATATATAGAGACGGTACAAGATCA G D Y G V P T F S N G G I Y R D G T R S -</p> <p>3467 GCTGATTTTAAATAGTAACAATCATCGTGCTTACGGGTGCGGTGGGTCTGGGGGTAGCGTT A D F N S N N H R A Y G C G G S G G S V -</p> <p>3527 AGTAGTCGAGTTGGGCAGCAACTTATTGIGTTAGCTATTGTTTCTGIGTTAATAGTGTCA S S R V G Q Q L I V L A I V S V L I V S -</p> <p>3587 CTATTACAACGATTAAGGTCTCCACCAGAACACATTTGTAATGGTGTCTGTGGTTAA 3643 L L Q R L R S P P E H I C N G A C G *</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The present invention concerns a method for inducing resistance to a virus comprising a TGB2 sequence into a cell plant or a plant, comprising the following steps: preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide sequence corresponding to at least 70 % of the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant, transforming a plant cell with the nucleotide construct, and possibly regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell. The present invention is also related to the plant obtained.</p>		





**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>P. SES. 03/WO</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. <b>PCT/EP 00/ 02176</b>	International filing date (day/month/year) <b>07/03/2000</b>	(Earliest) Priority Date (day/month/year) <b>12/03/1999</b>
Applicant <b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

### 1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☒ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☒ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of Invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

☒ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

1  
☐ None of the figures.



# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>P. SES. 03/W0</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. <b>PCT/EP 00/ 02176</b>	International filing date (day/month/year) <b>07/03/2000</b>	(Earliest) Priority Date (day/month/year) <b>12/03/1999</b>
Applicant  <b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

### 1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☒ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☒ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

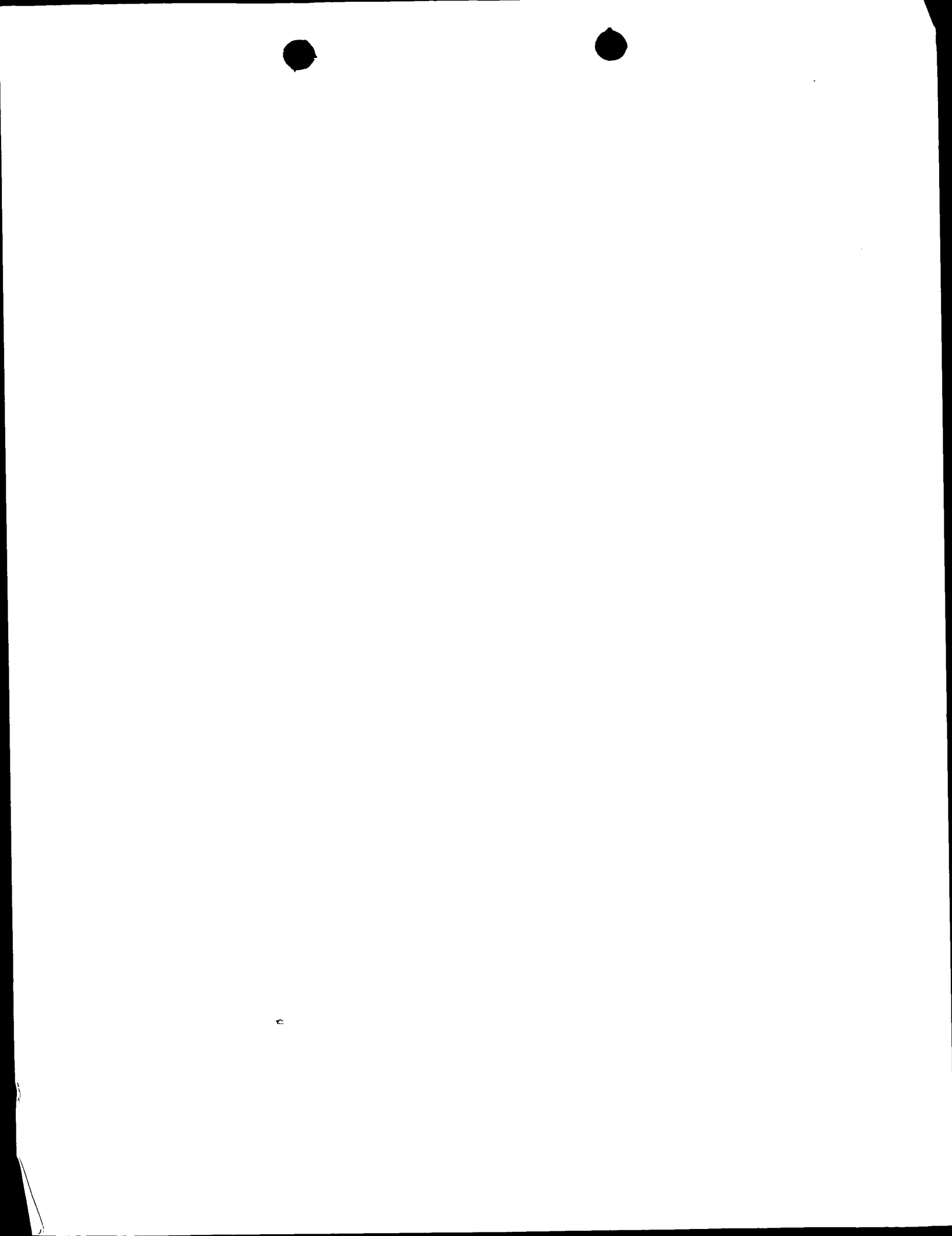
6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No.

☒ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

1  
☐ None of the figures.



# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT



(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>P.SES.03/WO</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/EP00/02176</b>	International filing date (day/month/year) <b>07/03/2000</b>	Priority date (day/month/year) <b>12/03/1999</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12N15/40</b>		
Applicant <b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.
  - ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:
  - I ☒ Basis of the report
  - II ☐ Priority
  - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
  - IV ☐ Lack of unity of invention
  - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
  - VI ☐ Certain documents cited
  - VII ☒ Certain defects in the international application
  - VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>06/09/2000</b>	Date of completion of this report <b>13.06.2001</b>
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  <b>European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465</b>	Authorized officer <b>Roscoe, R</b>  Telephone No. +49 89 2399 2554





**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP00/02176

**I. Basis of the report**

1. With regard to the **elements** of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):  
**Description, pages:**

1-16 as originally filed

**Claims, No.:**

1-22 as received on 30/05/2001 with letter of 30/05/2001

**Drawings, sheets:**

1/2,2/2 as originally filed

**Sequence listing part of the description, pages:**

1-3, filed with the letter of 10.10.00

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP00/02176

- ☐ the description,      pages:  
☐ the claims,      Nos.:  
☐ the drawings,      sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

*(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)*

6. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-22
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	

2. Citations and explanations  
**see separate sheet**

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:  
**see separate sheet**

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:  
**see separate sheet**



The documents mentioned in the present International Preliminary Examination Report are numbered as in the search report, i.e. D1 corresponds to the first document of the search report etc.

**V. Reasoned statement on Novelty, Inventive Step and Industrial Applicability**

**- Novelty (Art.33(2) PCT)**

No objections.

**- Inventive Step (Art.33(3) PCT)**

The problem solved by applicant is the provision of a further method of introducing resistance to TGB group I viruses into plants.

The solution is to express mutant (dominant negative) TGB2 proteins of the group I viruses in plant cells.

The solution is considered obvious. D1 and D6 both can be taken as closest prior art. Both documents demonstrate how dominant negative mutants of TGB2 can be used to engineer resistance to TGB-containing plant viruses.

D1 shows that a mutated 13 kDa gene (TGB2) of Potexvirus WCIMV-O provides resistance to systemic infection by WCIMV-O when introduced into N. benthamiana. The transgenic plants were further found to be resistant to other Potexviruses and to a Carlavirus. D1 further states in the abstract that virus resistance can be engineered in transgenic plants by expression of dominant negative mutant forms of TGB movement proteins. The examples given are group II viruses, yet no such group distinction is drawn in D1 - on p.10310, col.2 it is stated that TGB proteins have been shown to be essential in Potexviruses / Hordeiviruses (Group I) etc. Conserved features of all these viruses TGB2 genes have been identified - one of which was knocked out in the experimental part of D1 (see beginning of "Results"). There is absolutely no reason to believe that the teaching of D1 could not apply to Group I viruses.



D6 refers back to D1 and performs similar tests using transgenic potato plants expressing PVX TGB2. D6 shows that even distantly-related viruses having movement proteins (MPs) lacking significant sequence similarity can be inhibited by TMV MP. TGB block viruses do however share significant sequence similarity (across groups I and II - even though this distinction is not drawn in D6 (see Fig.1)). D6 clearly distinguishes viruses on the basis of whether they have a TGB or not (see last paragraph). Both group I and II viruses have similar TGB2 genes and thus it is obvious from D6 that teachings relating to the functionality of TGB2 genes in group II viruses also would be reasonably expected to apply to group I viruses.

Hence, the presently claimed subject-matter is entirely obvious in view of either D1 or D6.

- **Industrial Applicability (Art.33(4) PCT)**

The present claims appear to have industrial applicability.

**VII. Certain defects**

The only significant data supplied by applicant appears to be given in Fig.3. However, reading the description, and viewing Fig.3, it is unclear what is meant by D1, A2, A3 etc. It seems from p.9 that A(X) means an alanine substitution. T is clearly identified as w.t. The positions of the mutations are however not identified and thus the data is meaningless. Further, not all mutations appear to result in enhanced resistance, and those that do appear to rarely have a significant effect. Hence, the skilled person is not enabled to make mutations in TGB2 which will achieve resistance without himself experimenting around with various mutants. This is considered undue burden, since he is not taught what characteristics the mutants must have. Hence, subject-matter of claims is considered insufficiently disclosed.

**VIII. Certain observations**

- **Clarity (Art.6 PCT)**





**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

---

International application No. PCT/EP00/02176

Claim 1 - "homology" should be replaced by "identity". Same problem applies to claims 2, 11, 12.

Claim 8 - foreign DNA (not "foreigner DNA")

It is noted that the application as a whole is unclearly drafted. Hence, it may be impossible to overcome some of the present objections without introducing unallowable added matter. Should applicant file amendments he should clearly indicate an exact basis therefor.

- **Support in Description (Art.6 PCT)**

Claim 1 is a method of inducing resistance, yet the technical features required to reach this objective are not specified. Of critical importance is the TGB2 sequence. The claim does not define how to obtain dominant negative mutants which are presumably required. The sequence definition encompasses sequences which appear to induce increased susceptibility to group I virus insofar as Fig.3 can be understood i.e. w.t. TGB and other mutants increasing local lesion numbers. Since the claims all lack the essential feature of the "invention", they lack support in the description.



1

5

CLAIMS

1. Method for inducing resistance to a group I virus comprising a TGB2 sequence in a plant cell or a plant, comprising the following steps:

- preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide  
10 sequence having at least 70% homology with the nucleotide  
sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA,  
being operably linked to one or more regulatory  
sequence(s) active in a plant,
- transforming a plant cell with the nucleotide construct,  
15 and possibly
- regenerating a transgenic plant from the transformed  
plant cell.

2. Method according to the claim 1,  
characterised in that the nucleotide sequence of the  
20 nucleotide construct has at least 80% homology with the  
nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its  
complementary cDNA.

3. Method according to the claim 1 or 2,  
characterised in that the group I virus is selected from  
25 the group consisting of hordéiviruses, benyviruses,  
pecluviruses and pomoviruses, preferably selected from the  
group consisting of the beet necrotic yellow vein virus,  
the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus,  
the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

30 4. Method according to any of the preceding  
claims, characterised in that the plant cell is a stomatal  
cell.



2

5. Method according to any of the preceding claims, characterised in that the plant is selected from the group consisting of sugar beet, potato, barley or peanut.

5 6. Method according to claim 1 or 2, characterised in that the virus is BNYPV, the nucleotide sequence of TGB2 of said virus is comprised between the nucleotide 3287 and 3643 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of the BNYPV and the plant is a beet,  
10 preferably a sugar beet (*Beta vulgaris*).

7. Method according to any of the preceding claims, characterised in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence or a terminator sequence active in a plant.

15 8. Method according to claim 7 characterised in that the promoter sequence is a constitutive or a foreigner promoter sequence.

9. Method according to the preceding claim 7, characterised in that the promoter sequence is selected  
20 from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter, and/or the polyubiquitin *Arabidopsis thaliana* promoter.

10. Method according to any of the claim 7 to 9, characterised in that the promoter sequence is a  
25 promoter which is capable of being active mainly into the root tissues of plants, such as the par promoter of the haemoglobin gene from *Perosponia andersonii*.

11. Transgenic plant resistant to a group I virus comprising a nucleotide construct having at least 70%  
30 homology with the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant.

12. Transgenic plant according to the claim 11, characterised in that the nucleotide construct has a

AMENDED SHEET



nucleotide sequence corresponding to at least 80% homology with the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA.

13. Transgenic plant according to the claim  
5 11 or 12, characterised in that the virus is selected from the group consisting of hordéiviruses, benyviruses, pecluviruses and pomoviruses, preferably selected from the group consisting of the beet necrotic yellow vein virus, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus,  
10 the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

14. Transgenic plant according to the claims 11 to 13 being a plant selected from the group consisting of sugar beet, potato, barley or peanut.

15. Transgenic plant according to the claims  
15 11 or 12, characterised in that the transgenic plant being a beet, preferably a sugar beet (Beta vulgaris) the virus is BNYVV and the nucleotide sequence of TGB2 of said virus is comprised between the nucleotides 3287 and 3643 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of BNYVV or its  
20 corresponding cDNA.

16. Transgenic plant according to any of the preceding claims 11 to 15, characterised in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence and a terminator sequence active in a plant.

25 17. Transgenic plant according to any of the preceding claims 11 to 16, characterised in that the regulatory sequence(s) comprise a promoter sequence which is a constitutive or a foreign promoter sequence.

30 18. Transgenic plant according to the claim 17, characterised in that promoter sequence is selected from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter, and/or the polyubiquitin Arabidopsis thaliana promoter.



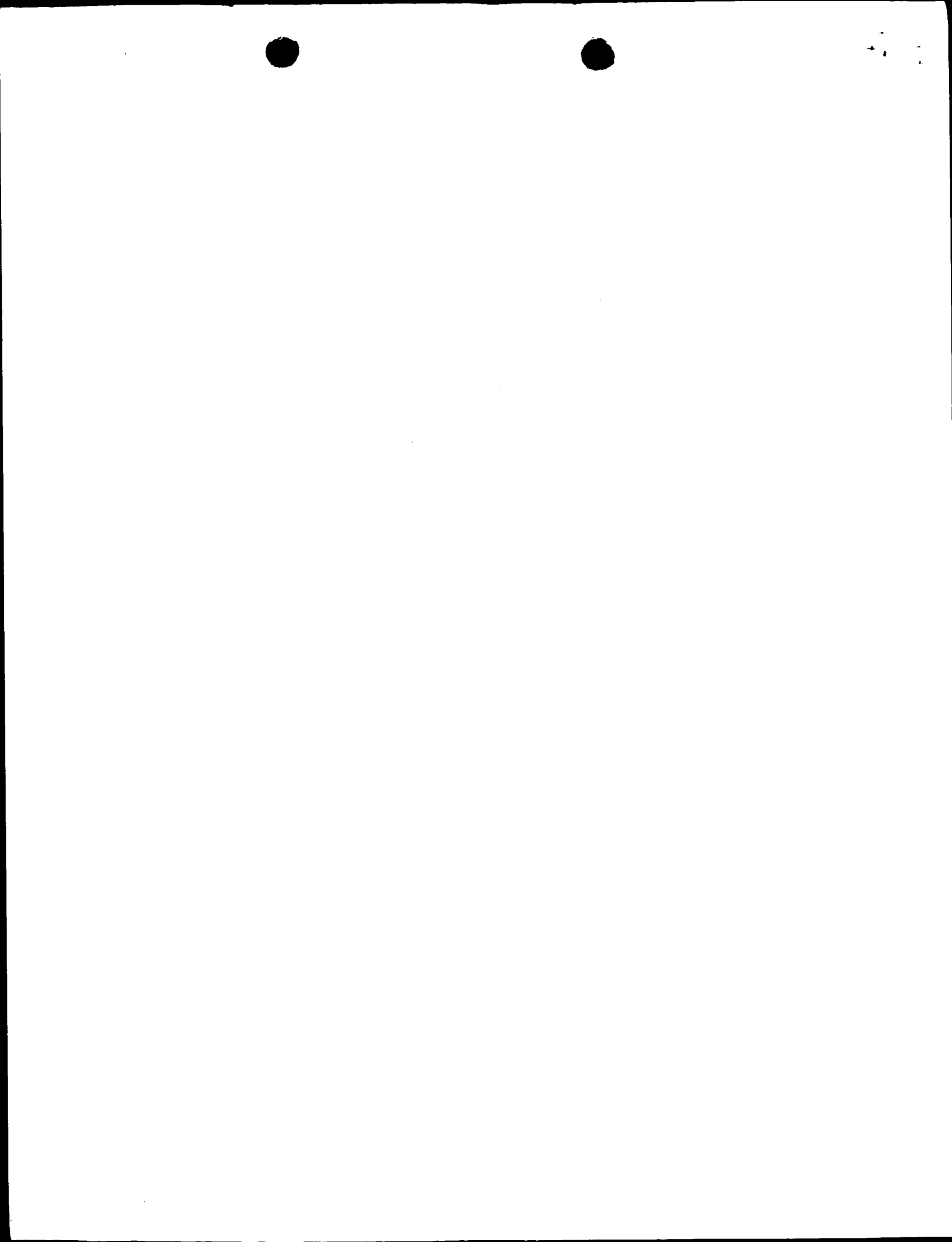


19. Transgenic plant according to claim 17 or 18 characterised in that the promoter sequence is a promoter which is capable of being active mainly into root tissues, such as the par promoter of the haemoglobin gene from Perosponia andersonii.

20. Transgenic plant according to any one of the claims 11 to 19, characterised in that it further carries natural tolerance to Group I viruses.

21. Transgenic plant according to any one of the claims 11 to 20, characterised in that it further comprises a pesticide, herbicide or fungicide resistance, preferably a resistance selected from the group consisting of nematode resistance, glyphosate resistance, glufosomate resistance and/or acetochloride resistance.

22. Transgenic plant tissue selected from the group consisting of fruit, stem, root, tuber, seed of a plant according to any of the claims 11 to 21.



Sugar Beet Line	time min	Pps plated (% GC)	Bialaphos resistant calli	Trans. Freq. (total)	Trans. Freq. (GC)
NF	10	180,000 (74)	22	$1.2 \times 10^{-4}$	$1.7 \times 10^{-4}$
	20	180,000 (71)	23	$1.3 \times 10^{-4}$	$1.8 \times 10^{-4}$
	30	83,000 (54)	28	$3.4 \times 10^{-4}$	$6.1 \times 10^{-4}$
SES1	20	220,000 (80)	8	$2.7 \times 10^{-5}$	$3.4 \times 10^{-5}$
	30	190,000 (85)	1	$5.3 \times 10^{-6}$	$6.2 \times 10^{-5}$
	40	210,000 (76)	4	$1.9 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5}$

In all the above cases the PEG concentration was 13.3% and the amount of DNA (pPG5) used was 50 $\mu$ g.

Following transformation, the protoplasts were transferred to an alginate medium containing bialaphos at a concentration of 0.25mg/litre, and cultured for four weeks, by which time the transformed guard cell calli were clearly identifiable and could be isolated and transferred to regeneration medium.

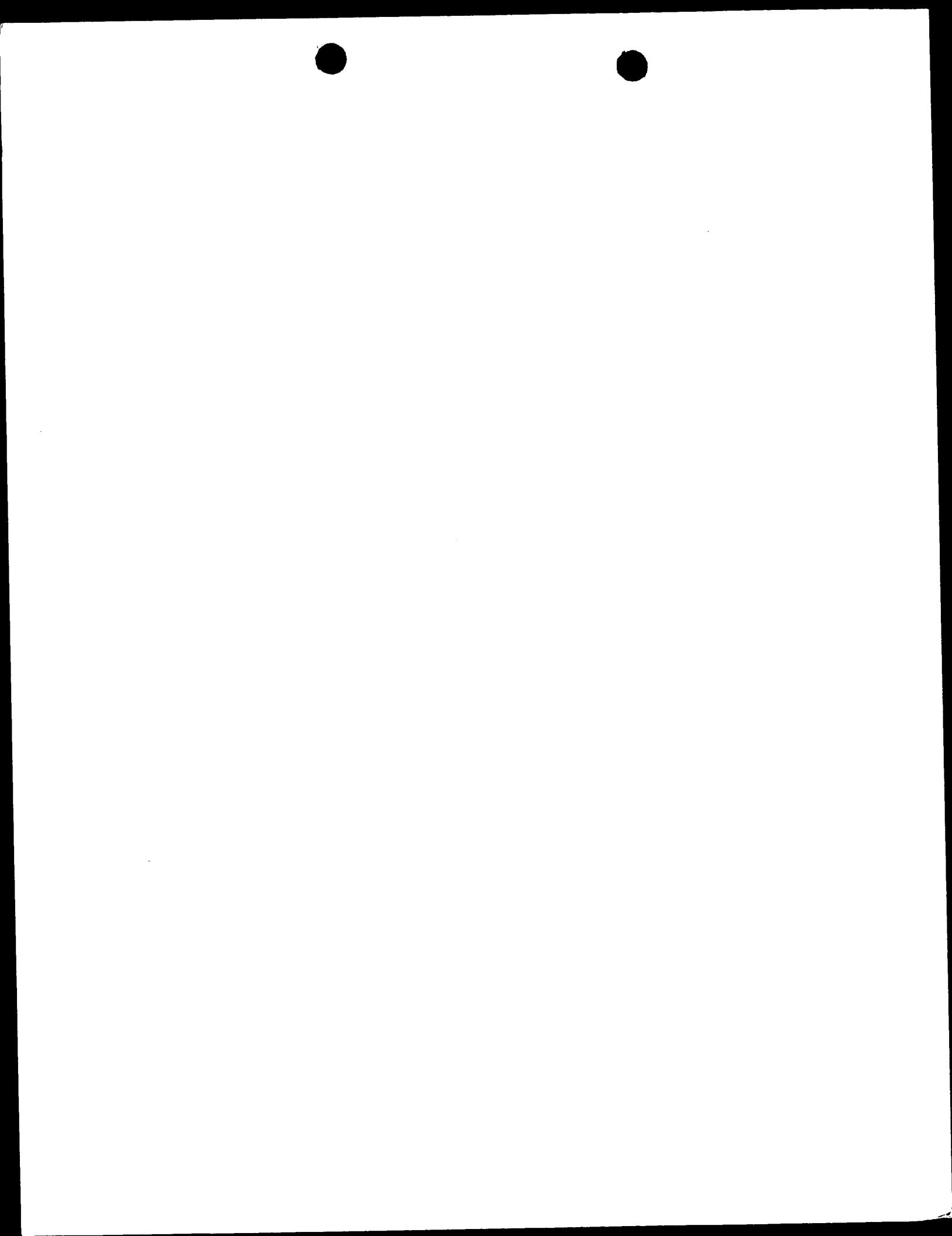
#### EXAMPLE 11

##### Genetic Transformation of Leaf Tissue

In this example the introduced DNA was from a plasmid pPG5 which contains the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene and also, as a selectable marker gene, a sequence specifying resistance to the herbicide Bialaphos or phosphinothricin to which sugar beet is normally sensitive.

Leaves from axenically grown plants of two sugar beet genotypes (designated BOA113 and BUM2) were excised and placed, abaxial surface uppermost, on De Greef and Jacobs media solidified with 0.6% agar. Three to five leaves were used in each 9 cm Petri dish.

Gold particles (1.6  $\mu$ m diameter) were coated with a plasmid which contains a gene encoding phosphinothricin



acetyl transferase which gives resistance to the herbicide phosphinothricin (bialaphos, BASTA) as a selectable marker and one copy of a gene encoding  $\beta$ -glucuronidase (gus), a detectable marker gene. The particles were coated using the calcium chloride/spermidine precipitation method and resuspended in 100% ethanol. Aliquots of 10  $\mu$ l were pipetted on to individual macrocarriers of the DuPont Biolistic PDS1000/He gene gun and allowed to dry over silica gel crystals.

The bombardment parameters used were: a gap of one sixteenth inch between the rupture disc and the macrocarrier, a macrocarrier travel distance of 6mm, rupture disc pressures of 100 to 1100 psi, target distances of 5, 8 or 12 cm and a partial vacuum of 28 inches of mercury in the target chamber.

After bombardment, leaves were cultured for 2 days at 23°C prior to staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-Gluc) for histochemical localisation of gus gene expression. Post staining, the leaves were decolourised in 95% ethanol at 65°C for 20 minutes. Cells showing gus expression were termed "colour-forming units (CFUs)". The frequency of guard cell CFUs among total epidermal CFUs for both genotypes was in the range 20-40%.

#### EXAMPLE 12

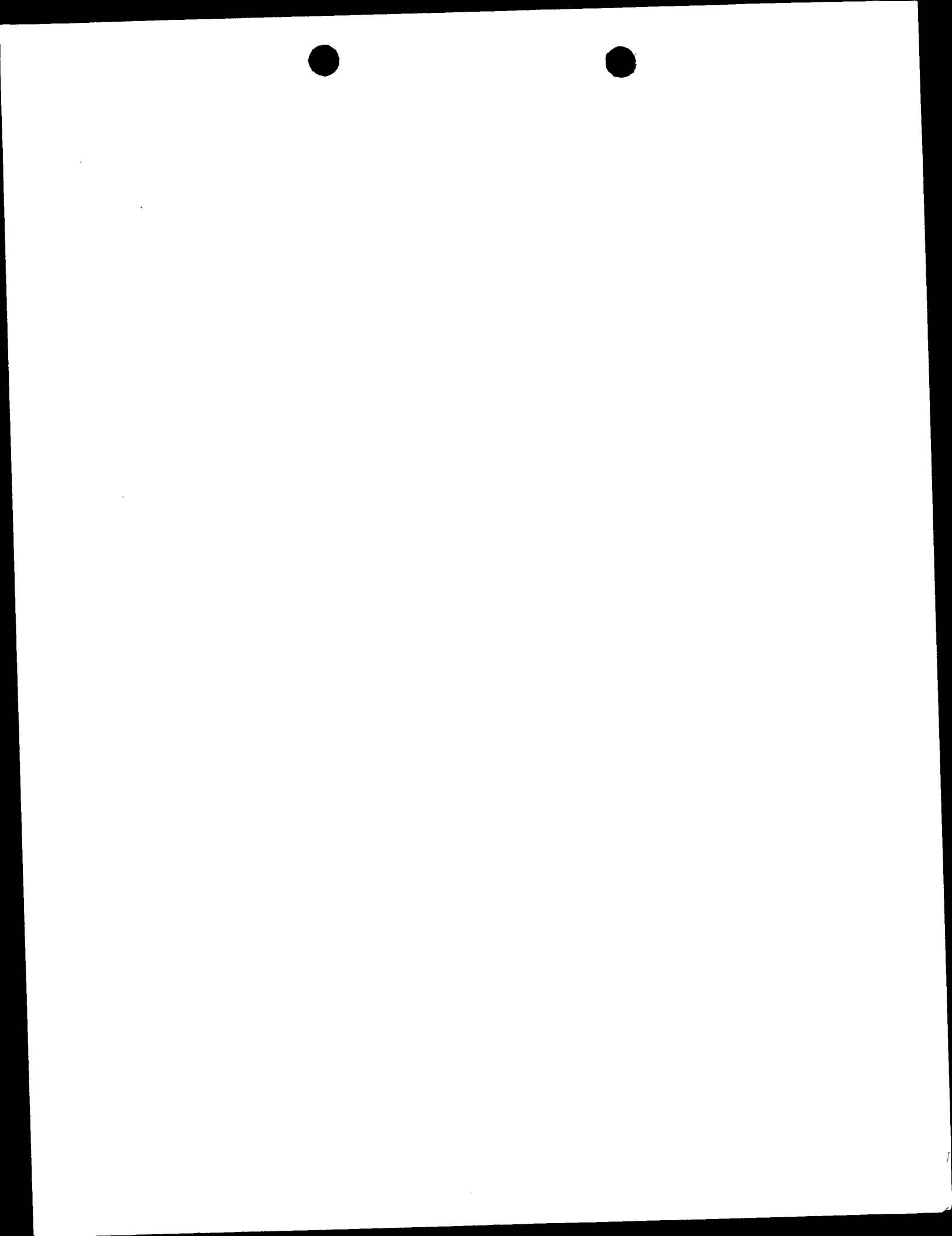
##### Callus Culture and Regeneration

After 21 days, the pieces of alginate containing the now-visible microcalli were transferred to 9 cm Petri dishes containing 20 ml Medium K. Culture was in the dark as above.

Friable, watery-type calli on reaching the size of approximately 1-2 mm in diameter were individually picked off and cultured in groups of 20 on fresh Medium K. At this stage both PCR analysis and a histochemical GUS assay confirmed the presence of transformants.

At two-weekly intervals all calli were subcultured on to fresh medium.

Regenerants appeared during the first 8 weeks of culture



of individual calli. When the first shoots were visible and had reached a size of approximately 2 mm the dish was transferred into the light (3000 lux), 25°C, 15 hour day length.

Plantlets approximately 4 mm long were transferred to individual culture tubes containing 15 ml of Medium K and were further subcultured in the light as above.

#### EXAMPLE 13

##### Rooting and Transfer to the Soil

When the plantlets had reached the four-leaf stage (usually after 5 to 6 weeks with one subculture after three weeks) they were transferred to culture tubes containing 15 ml of Medium L and further cultured as above.

When at least one root had reached a length of 1 cm, the plantlets were removed from the culture tubes and, washed under running tap water to remove all fragments of the agar, and transferred to soil in 9 cm pots in the greenhouse.

Plantlets were covered with a transparent plastic cup to provide a humid environment for seven days, after which they could be grown without protection.





## CLAIMS

1. A method of producing a plant, comprising culturing a plant cell in a regeneration medium, characterised in that the said cell is a stomatal cell.
2. A method as claimed in claim 1, in which the said stomatal cell is subjected to regeneration in an intact organ containing said cells.
3. A method as claimed in claim 1, in which the said stomatal cell is isolated from plant tissue containing same..
4. A method as claimed in claim 1, in which the said stomatal cell is in an isolated leaf epidermis.
5. A method as claimed in any preceding claim, in which the plant is beet (Beta vulgaris).
6. A method as claimed in claim 5 in which the plant is sugar beet.
7. A method as claimed in any preceding claim, in which regeneration includes the production of callus on a medium which is free of hormones.
8. A method for the genetic transformation of plants comprising introducing an hereditary material into a cell of the said plant and regenerating whole plants from the transformed cell, characterised in that the said cells are stomatal cells.



9. A method as claimed in claim 8, in which the transformation is conducted on intact tissue containing stomata.
10. A method as claimed in claim 9, in which the tissue is senescent leaf tissue.
11. A method as claimed in claim 9 or claim 10, in which the said tissue is leaf epidermis.
12. A method as claimed in claim 9 or 10 or 11, in which transformed stomatal tissue is macerated to produce a cell suspension from which plants are regenerated.
13. A method as claimed in any of claims 8 to 12, in which the stomatal cells are converted to protoplasts prior to regeneration.
14. A method as claimed in any of claims 8 to 13, in which the said hereditary material is a DNA construct which includes a selectable marker gene which does not specify resistance to an antibiotic and the transformed tissue is exposed to the appropriate selective agent.
15. A method as claimed in any of claims 8 to 14, in which the transformation is conducted on a cell population containing guard cells.
16. A method as claimed in claim 15, in which the transformation is conducted on a cell population enriched in guard cell concentration.
17. A method as claimed in any of claims 8 to 16, in which the transformation is conducted on a cell



suspension.

18. A method as claimed in any of claims 8 to 17, in which the stomatal cells are converted into protoplasts by enzymatic digestion of the cell wall before or after transformation.
19. A method as claimed in any of claims 8 to 18, in which the transformation method comprises mixing a suspension of stomatal cells with a microscopic fibrous material and agitating same in the presence of the hereditary material.
20. A method as claimed in any of claims 8 to 18, in which regeneration includes the production of callus on a medium which is free of hormones.
21. A method for the transformation of Beta vulgaris, comprising the steps of:
  - (i) providing plant tissue containing stomatal cells;
  - (ii) introducing hereditary material into the said stomatal cells by direct DNA insertion; and,
  - (iii) regenerating plants from the transformed stomatal cells.
22. A method as claimed in claim 21, in which the introduced hereditary material is a DNA construct which does not contain a gene specifying antibiotic resistance.
23. A method as claimed in claim 21 or claim 22, in which the said plant tissue is leaf epidermis.



✓

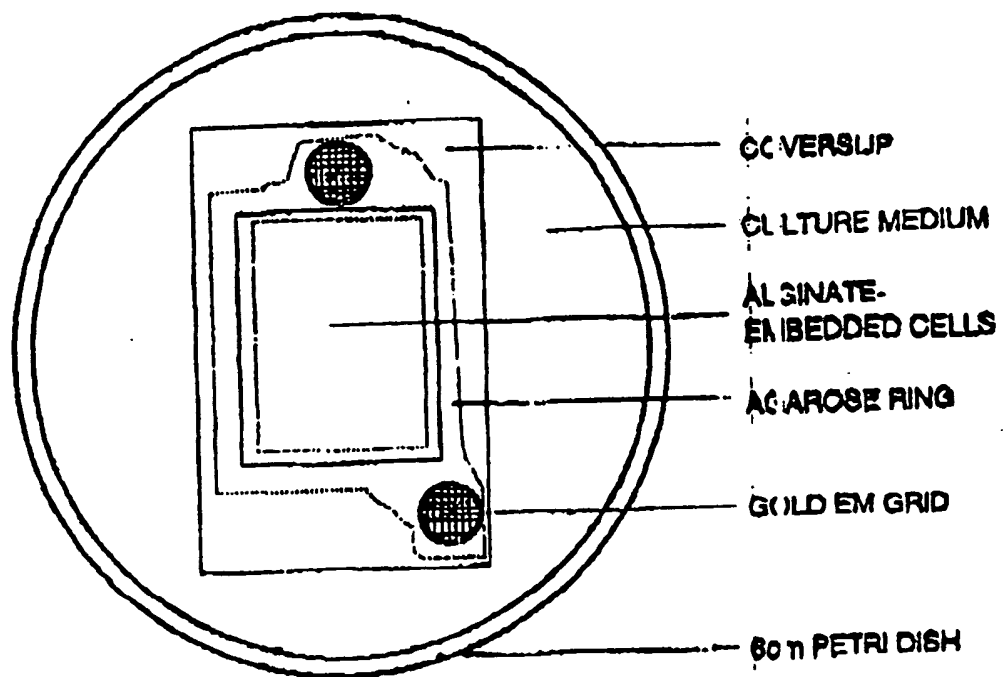


Figure 1





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No

GB 94/02252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A01H4/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	PLANT SCIENCE, vol. 97, 1994, IRELAND pages 199 - 208 P. SAHGAL ET AL 'Regeneration of plants from cultured guard cell protoplasts of Nicotiana glauca (Graham)' cited in the application	1, 3
Y	see page 200, right column, line 38 - page 205, left column, line 3  --- -/--	1, 5-10, 12-19, 21, 23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 January 1995

Date of mailing of the international search report

03.02.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 -  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

DISSEN, H



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No.

T/GB 94/02252

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BULLETIN OF THE POLISH SOCIETY OF SCIENCES: BIOLOGICAL SCIENCES, vol.32 11/12, 1984 pages 435 - 437 U.KOTOWSKA & J.ROGOZINSKA 'preliminary report on epidermis culture of sugar beet' cited in the application see the whole document ---	1-6,21
Y	PLANT SCIENCE LETTERS, vol.17, 1979, NORTH-HOLLAND pages 55 - 61 W.DE GREEF & M.JACOBS 'In vitro culture of the sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity' cited in the application see the whole document ---	1,5-7
A	---	20
Y	Y.P.S.BAJAJ -ED- 'Biotechnology in agriculture and forestry, Vol.23 Plant protoplasts and genetic engineering IV' 1993, SPRINGER VERLAG, BERLIN cited in the application chapter II.2 pages 147-169 K.LINDSEY ET AL : "Transformation in sugarbeet (Beta vulgaris L.)" see page 149, line 4 - page 150, line 9 ---	5,6, 8-10, 12-19, 21,23
Y	THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol.84, 1992, BERLIN pages 560 - 566 H.F.KAEPLER ET AL 'Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells' cited in the application see the whole document ---	8,12-19
A	---	21,23
A	PLANT, CELL AND ENVIRONMENT, vol.14, 1991 pages 691 - 697 W.CUPPLES ET AL 'Division of guard cells protoplasts of Nicotianan glauca (Graham) in liquid cultures' cited in the application see the whole document ---	1-4, 8-13, 15-18
A	Y.P.S.BAJAJ -ED- 'Biotechnology in agriculture and forestry Vol. 2 Crops I.' 1985, SPRINGER VERLAG, BERLIN chapter II.12, pages 462-470 A.I.ATANASSOV: "Sugar beet (Beta vulgaris L.)" see page 467, line 25 - page 468, line 28 ---	1,5-7,20

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No

T/GB 94/02252

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	US,A,5 302 523 (COFFEE ET AL) 12 April 1994 cited in the application see the whole document ---	8,12-14, 17-19,21
A,P	PLANTA, vol.192, 1994, BERLIN pages 84 - 91 V.A.IGLESIAS ET AL 'Transient expression of visible marker genes in meristem cells of wheat embryos after ballistic micro-targetting' cited in the application see the whole document ---	8,14
A	BEITRÄGE BIOLOGISCHE PFLANZENZUCHTUNG, vol.67, no.2, 1992 pages 209 - 223 U.KOTOWSKA 'Morphogenetische Fähigkeiten des Blütenstandsgetriebgewebes bei Zuckerrüben in In-vitro-Kulturen; II. Die Teilung und Differenzierung der Zellen' cited in the application ---	
A	D.A.EVANS ET AL -EDS- 'Handbook of plant cell culture, Vol. 4. Techniques and applications' 1986 , MACMILLAN PUBLISHING COMP. , NEW YORK chapter 23, pages 652-680, A.I.ATANASSOV :"Sugar beet" ---	
A	ACTA HORTICULTURAE PROC.1ST.ISHS SYMP. IN VITRO CULTURE & HORTIC. BREEDING, vol.280, 1990 pages 271 - 276 E.FORTI ET AL 'Callus and cell culture in sugarbeet' -----	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 94/02252

Patent document  
cited in search report

Publication  
date

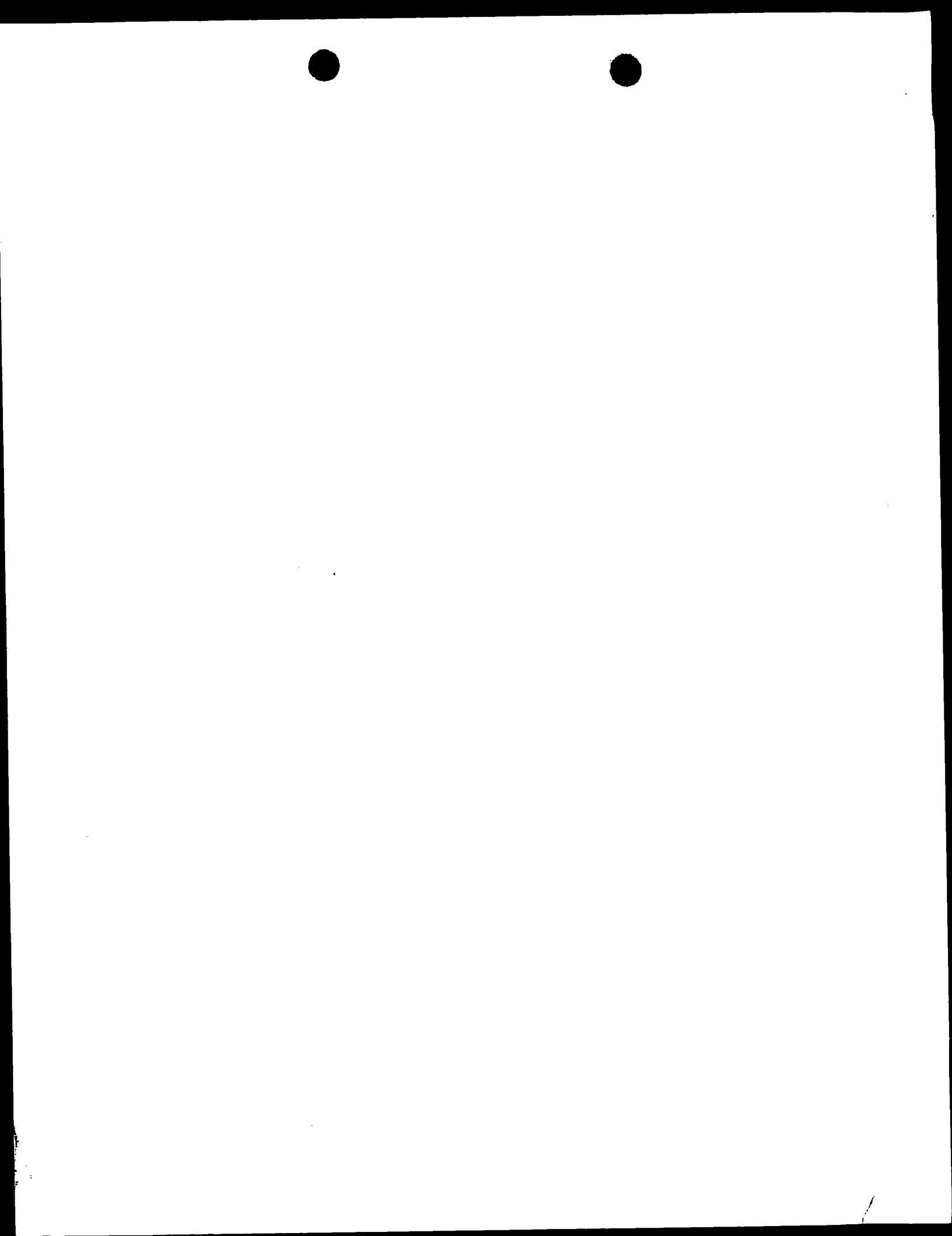
Patent family  
member(s)

Publication  
date

US-A-5302523

12-04-94

NONE





although incapable of substituting for wild-type P15 in a complementation experiment, can interfere with the cell-to-cell movement activity of the wild-type P15 produced from RNA 2. Presumably, the full-length and truncated forms of P15 compete with one another for binding sites on another component (which could be of either viral or cellular origin) involved in the movement process.

As noted above, sequence comparisons between different viruses possessing a TGB have revealed little sequence similarity between the different TGB3 genes. For example, the 17 kDa TGB3 protein (P17) of peanut clump furovirus (PCV) displays no significant sequence similarity with P15 of BNYVV (4) even though both viruses can infect C. quinoa. To determine whether independent expression of the PCV TGB3 protein can interfere with a BNYVV infection in a manner similar to that observed with rep15, a BNYVV RNA 3-derived replicon containing the PCV TGB3 (repPCV-P17; Figure 1) was constructed. C. quinoa leaves inoculated with BNYVV RNAs 1 and 2 plus repPCV-P17 did not develop symptoms and no progeny BNYVV RNA's could be detected by northern blot (Figure 5A, lane 9). This observation suggests that the pathways by which BNYVV and PCV move from cell-to-cell in C. quinoa share at least one common element which, in spite of their dissimilarity in sequence, interacts with the TGB3 products of both viruses.

The Inventors have shown that replicons carrying P42 and P13 can complement BNYVV RNA 2 carrying the corresponding defective gene but that a replicon carrying P15 cannot. In the latter case, complementation can occur, however, if the P15 gene is supplied as the second gene on a dicistronic RNA (rep1315) carrying the P13 gene in first position. It should be noted that the

relative disposition of the P13 and P15 genes on rep1315 is identical to their disposition on RNA 2sub<sub>6</sub>, the subgenomic RNA which is believed to direct synthesis of both proteins in wild-type infections. This suggests that successful  
5 cell-to-cell movement of BNYVV requires the presence of P13 and P15 in appropriate relative amounts and that production of both proteins from the same subgenomic RNA represents a mechanism for coordinating their synthesis. The inability of rep15 to complement the P15 mutant RNA 2 transcript pB2-  
10 14-J and its ability to inhibit infection by wild-type virus would then both be due to over-production of P15 relative to P13 when the former is translated from the replicon and the latter from RNA 2. When P15 is expressed from the dicistronic replicon rep1315, on the other hand,  
15 appropriate relative P13-P15 levels would be produced, allowing cell-to-cell movement to proceed. The "correct" relative levels of accumulation of P13 and P15 in a wild-type infection are not known. Translation of rep1315 in wheat germ extract produced three to five times more P13  
20 than P15 but such experiments do not necessarily reflect the situation in planta since the turnover rates of the two proteins may differ significantly. Note that these results indicate that TGB-mediated cell-to-cell movement is less sensitive to over-expression of P42 and P13 relative to the  
25 "correct" levels characteristic of a normal infection since co-inoculation of rep42, rep13 or rep1315 with wild-type virus did not inhibit infection (Figure 5, lanes 3-5), although the lesions produced in the presence of rep13 and rep1315 were necrotic. Thus, it shows that expression of  
30 P15 in transgenic plants could provide a mechanism for inducing BNYVV-resistance ("pathogen-derived resistance"; ref. 23) in such plants, provided that sufficient P15

expression levels can be attained.

To gain a better understanding of how the relative levels of P13 and P15 are regulated during translation will require learning how the P15 cistron is accessed by ribosomes on RNA 2sub<sub>D</sub>. Translation initiation at an internal cistron of a eucaryotic messenger RNA may occur by several mechanisms, including (i) leaky scanning, where a fraction of the ribosomal subunits which begin scanning the RNA at the 5'-end move past the first (non-optimal) upstream AUG without initiating (24), and (ii) internal entry, where ribosomal subunits bind directly to a special sequence on the RNA near the internal initiation codon (25). A third possible mechanism, termination-reinitiation (24), appears unlikely to apply to any of the TGB-containing viruses because the overlap between the TGB2 and TGB3 cistrons would require ribosomes to scan backwards after terminating TGB2 to reach the TGB3 initiation codon. It has been suggested that the TGB3 proteins of BSMV and PVX are translated by a leaky scanning mechanism (8, 9). The BNYVV P15 gene may also be produced by leaky scanning although it should be noted, however, that the context of the BNYVV P13 initiation codon (AUAAAUGU) is nearly optimal and there are also two downstream AUG's which scanning subunits would have to ignore to reach the P15 initiation codon.

#### EXAMPLES

The following examples are transformation of plant made by the technique described in the International Patent Application WO95/10178 incorporated herein by reference.

The plant material and growth conditions were the ones described by Hall et al., Plant Cell Reports 12, pp. 339-342 (1993) Pedersen et al., Plant Science 95, pp. 89-97 (1993), and Hall et al, Nature biotechnology 14, 5 1996, in press.

#### Plasmid vectors and DNA preparation

The plasmid pET-P15 (harbouring the P15 nucleic acid sequence) was restricted at its single BamHI  
10 site and blunt-ended with T4 DNA polymerase. After purification by electrophoresis in 0.8% agarose gel, the linear plasmid was restricted at its single NcoI site. The P15 gene fragment of 400 bp was purified by electrophoresis and inserted into pMJBX-Ub (harbouring the Arabidopsis  
15 polyubiquitin promoter (Norris et al., Plant Molecular Biology 21, pp. 895-906 (1993), a TMV enhancer sequence and the Nos 3' terminator) cut with NcoI and SmaI restriction endonucleases. In the plasmid so obtained (pMJBX-Ub-P15), the nucleic acid sequence of the P15 gene  
20 is placed under the control of the Arabidopsis polyubiquitin promoter followed by the TMV enhancer sequence. The EcoRI fragment from plasmid pB235Sack contains the pat gene, used as the selective marker, encoding phosphinothricin acetyl transferase (obtained from  
25 Agrevo, Berlin Germany). On this EcoRI fragment, the nucleic acid sequence of the pat gene is under the control of the 5' and 3' expression signals of the Cauliflower virus. The plasmid pMJBS6, resulting from the combination of this EcoRI-pat fragment and a partial EcoRI digestion of  
30 plasmid pMJBX-Ub-P15, contains both the pat and the P15 genes. This pMJBS6 plasmid is a high-copy plasmid based on the pUC13 vector and contains also the -lactamase gene

(amp<sup>r</sup>). In the plasmid pIGPD7, harbouring the same pat fragment as pB235Sack, the  $\beta$ -lactamase gene was replaced by an igpd (imidazole glycerol phosphate dehydratase) gene from *Saccharomyces cerevisiae* (Struhl et al., Proceedings of the National Academy of Science USA 73, pp. 1471-1475 (1976). Selection for and maintenance of the plasmid in *Escherichia coli* was achieved by complementation of an auxotrophic hisB strain SB3930 on minimal medium in the absence of antibiotics. The P15 fragment, with its ubiquitin promoter and terminator sequence, was purified as a 2500 bp fragment obtained from the pMJBX-Ub-P15 plasmid after it was cut at the single HindIII site, followed by a partial EcoRI restriction. This fragment was blunt-ended and inserted in a blunt-ended pIGPD7 plasmid, cut at the single NcoI site. The resulting pIGPDS4 plasmid contains both the pat and the P15 genes on a vector without the  $\beta$ -lactamase gene.

#### Plant material

In vitro shoot cultures of sugar beet plantlets were initiated to provide a reusable and uniform source of sterile starting material and were maintained with a 4-weekly subculture period as described by Hall et al., Plant Cell Reports 12, pp. 339-342 (1993).

#### Large-scale isolation of sugar beet epidermis

A modified version of the blender method by Kruse et al., Plant Physiology 690, pp. 1382-1386 (1989) was used. For each isolation, 2 g leaves (with the midribs removed) from 4 week old shoots was blended in a Waring blender at maximum speed (23000 rpm) for 60 sec in a 250 ml

metal beaker containing 50 ml cold (4 °C) Ficoll medium (100 g /l Ficoll, 735 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/l PVP40, autoclaved). The epidermal fragments were then recovered on a 297  $\mu\text{m}$  nylon filter and washed with 500 ml sterile tap water. These were rinsed from the filter into a 9 cm Petri dish using 10 ml CPW9M containing 3.8% (w/v)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Krens et al., Theoretical and Applied Genetics 79, pp. 390-396 (1990)). Any remaining leaf fragments were removed and dishes were preincubated for 1 h at room temperature.

10

Guard cell protoplast isolation from enriched epidermis fractions

To recover the epidermis fraction, the suspension was centrifuged for 1 min at 55 x g after which the supernatant was removed. The pellet was resuspended in 50 ml enzyme mix and 5 ml aliquots were transferred to each of 10, 6 cm Petri dishes (Greiner, TC quality), sealed with parafilm and incubated overnight at 25 ° C in darkness with gentle agitation. The digestion medium consisted of CPW9M supplemented with 0.5% (w/v) Cellulase RS and 3% (w/v) Macerozyme R10 (Yakult Honsha, Tokyo, Japan), pH 5.8. The following morning, the protoplasts were generally seen floating near the surface of the digestion mix. After gentle agitation of the suspensions using a sterile pipette to release the protoplasts still adhering to cuticle fragments, the digestions were pooled and passed through 297 and 55  $\mu\text{m}$  nylon filters. The filtrate was mixed with an equal volume of iso-osmotic Percoll containing 15% (w/v) sucrose (Percoll15S) and divided over 12 x 12 ml centrifuge tubes. In each tube, first 1 ml CPW15S (Krens et al., 1990) and then 0.5 ml 9% (w/v) mannitol containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$

(9M) were carefully layered on top of the protoplast suspension. After centrifugation at 55 x g for 10 min the viable guard cells were visible in bands at the CPW15S/9M interface. To concentrate the protoplasts, these bands were  
5 collected and mixed with Percoll15S to give a final volume of 16 ml. This was then divided between 2 centrifuge tubes, layered as above and recentrifuged. Careful removal of the 9M layers yielded the enriched guard cell protoplast fraction for subsequent counting using a haemocytometer.

10

#### Protoplast transformation

Transformations were performed in 12 ml centrifuge tubes, each containing  $1 \times 10^6$  protoplasts suspended in 0.75 ml 9M medium. Plasmid DNA (50  $\mu$ g of  
15 pMJBX-Ub-P15 and pIGPDS4) was added and, immediately after mixing, 0.75 ml PEG medium was added dropwise (40% PEG 6000 dissolved in F medium (Krens et al., Nature 296, pp. 72-74, (1982)). After thorough mixing, the suspension was kept at room temperature for 30 min with intermittent agitation.  
20 Subsequently, at 5 min intervals, 4 x 2 ml aliquots of F medium were added. After centrifugation for 5 min at 55 x g the supernatant was discarded and the protoplast pellet resuspended in 9M and recentrifuged. The cells were finally resuspended in 1 ml of 9M medium for counting.

25

#### Protoplast culture and selection

Protoplasts were embedded in Ca alginate and cultured in modified, liquid K8P medium (Hall et al., 1990). To select for stably transformed cells, bialaphos,  
30 the active compound of Herbiace (Meiji Seika Ltd, Japan) was added after 7 days, to give a final concentration of 200  $\mu$ g/l. On day 13, the alginate discs were cut into 3 mm

slices and transferred to PGo medium (De Greef and Jacobs, Plant Science Letters 17, pp. 55-61, 1979) supplemented with 1  $\mu$ M BAP (PG1B) and 250  $\mu$ g/l bialaphos and solidified with 0.8% agarose.

5

#### Callus culture and regeneration

After 21 days, the pieces of alginate containing the non-visible microcalli were transferred to 9 cm Petri dishes containing 20 ml Medium K (3% sucrose, 0.8% agarose, 1  $\mu$ M BAP, PGo medium, pH = 5.8 autoclaved).  
10 Culture was in the dark as above.

Friable, watery-type calli on reaching the size of approximately 1-2 mm in diameter, were individually picked off and cultured in groups of 20 on fresh Medium K.  
15 At this stage, PCR analyses confirmed the presence of transformants.

At two-weekly intervals all calli were subcultured on to fresh medium.

20 Regenerants appeared during the first 8 weeks of culture of individual calli. When the first shoots were visible and had reached a size of approximately 2 mm, the dish was transferred into the light (3000 lux), 25 °C, 15 hour day length.

25 Plantlets approximately 4 mm long were transferred to individual culture tubes containing 15 ml of Medium K and were further subcultured in the light as above.

#### 30 Rooting and transfer to the soil

When the plantlets had reached the four-leaf stages (usually after 5 to 6 weeks with one subculture



after 3 weeks), they were transferred to culture tubes containing 15 ml of Medium L (3% sucrose, 0.8% agarose, 25  $\mu$ M indolebutyric acid (IBA), PGo medium, pH = 5.8 autoclaved) (PGo medium described by De Greef W. et al.,  
5 Plants Science Letters 17, pp. 55-61 (1979)) and further cultured as above.

When at least one root had reached a length of 1 cm, the plantlets were removed from the culture tubes and washed under running tap water to remove all fragments  
10 of the agar, and transferred to soil in 9 cm pots in the greenhouse.

Plantlets were covered with a transparent plastic cup to provide a humid environment for 7 days, after which they could be grown without protection.

15 The plant transformed by the sequence SEQ ID NO. 1 according to the invention is recovered and has been expressed P15.

#### DNA analysis

20 Genomic DNA isolated from the primary transformants is electrophoresed in a 0.8% agarose gel after treatment with restriction enzymes and transferred to a nitrocellulose membrane using standard procedures, according to the manufacturer's protocol. Hybridisation is  
25 performed with the DNA, as  $\alpha^{32}$ P-dATP-labelled probes, whose presence it is desired to establish. The membranes were washed to a final stringency of 0.1% x SSC, 0.1% SDS at 60 °C. The hybridized DNA is visualised by darkening the X-ray film for 24 to 48 hours.

30

### PCR analysis

Standard PCR techniques were used to detect a range of intact plasmid sequences. Reactions were performed using 25 cycles of 1 min denaturation at 94 °C, 1 min  
5 annealing; 2 min extension at 72 °C, with a final extension period of 5 min. The annealing temperatures were optimized for each primer combination. The presence of the coding region of the BNYVV P15 gene in the sugarbeet genome was verified by PCR using a pair of oligonucleotides as primers  
10 : MOV1, sense primer [5'-GGTGCTTGTGGTTAAAGTAGATTTATC-3' (nucleotides 3 to 29 on SEQ ID NO 1)] and MOV2 antisense primer [5'-CTATGATACCAAACCAAACTATAGAC-3' (complementary to the nucleotides 369 to 395 on SEQ ID NO 1)]. This 393 bp long fragment comprises the whole coding region of the P15  
15 gene for BNYVV (see figure 7).

Figure 7: Analysis of PCR products obtained with sugarbeet DNA from P15-transformants (lane 5 to 7) and an untransformed plant (lane 4). Low DNA Mass Ladder® (Life Technologies) was used as a size marker (lane 1).  
20 Lane 2 and 3 correspond to the positive controls (pMJBS6/pIGPDS4). The arrow on the left shows the position of the expected PCR product.

### Southern blot hybridisation analysis

25 The integration of the BNYVV P15 gene in the sugarbeet genome was verified by Southern blot hybridisation. Total DNA of primary transgenic regenerants was isolated, digested with restriction enzymes (PstI, KpnI, NcoI, SacI), electrophoresed, blotted and hybridised  
30 with BNYVV P15-specific <sup>32</sup>P-labelled probes using PCR amplified MOV1-MOV2 fragment (see figure 8).

Figure 8: Southern blot analysis. Lambda DNA digested with HindIII was used as a size marker (lane 1). Lanes 2 to 16, DNA of the transgenics: 2 to 4 digested with SaCI, 6 to 8 digested with PstI, 10 to 12 digested with NcoI, 14 to 16 digested with KpnI. Lanes 5, 9, 13 and 17 correspond to the untransformed plant.

REFERENCES

1. Richards K.E. & Tamada T., *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, pp. 291-313 (1992)
2. Gilmer D. et al., *Virology* **189**, pp. 40-47 (1992)
- 5 3. Bouzoubaa S. et al., *J. Gen. Virol.* **68**, pp. 615-626 (1987)
4. Herzog E. et al., *J. Gen. Virol.* **18**, pp. 3147-3155 (1994)
5. Scott K. P. et al., *J. Gen. Virol.* **75**, pp. 3561-3568 (1994)
- 10 6. Koonin E.V. & Dolja V.V., *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* **28**, pp. 375-430 (1993)
7. Schmitt C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, pp. 5715-5719 (1992)
- 15 8. Morozov S.Y. et al., *J. Gen. Virol.* **72**, pp. 2039-2042 (1991)
9. Zhou H. & Jackson A.O., *Virology* **216**, pp. 367-379 (1996)
10. Quillet L. et al., *Virology* **172**, pp. 293-301 (1989)
- 20 11. Bleykasten et al., *J. Gen. Virol.* **77**, pp. 889-897 (1996)
12. Jupin I. et al., *Virology* **178**, pp. 273-280 (1990)
13. Sanger F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, pp. 5463-5467 (1977)
- 25 14. Fritsch C. et al., *J. Gen. Virol.* **46**, pp. 381-389 (1980)
15. Laemmli U.K., *Nature* **227**, pp. 680-685 (1972)
16. Schagger H. & von Jagow G., *Anal. Biochem.* **166**, pp. 368-379 (1987)
- 30 17. Lemaire O. et al., *Virology* **162**, pp. 232-235 (1988)
18. Niesbach-Klösgen U. et al., *Virology* **178**, pp. 52-61 (1990)

19. Hehn A. et al., *Virology* 210, pp. 73-81 (1995)
20. Tamada T. et al., *J. Gen. Virol.* 70, pp. 3399-3409 (1989)
21. Kozak M., *J. Cell. Biol.* 108, pp. 299-241 (1989)
- 5 22. Pelletier J. & Sonenberg N, *Nature* 334, pp. 320-325 (1988)
23. Tamada T. & Baba T., *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 39, pp. 325-332 (1973)
24. Kuszala M. & Putz C., *Annals of Phytopathology* 9, 10 pp. 435-446 (1977)
25. Keskin B., *Archiv für Mikrobiology* 49, pp. 348-374 (1964)
26. Asher M.J.C., *Rhizomania In The sugar beet crop*, ed. D.A. Cooke and R.K. Scott, Chapman & Hall, London, 15 pp. 312-338 (1993)
27. Richard-Molard M., *Rhizomanie In Institut français de la betterave industrielle. Compte-rendu des travaux effectués en 1994*, ITB, Paris pp. 225-229 (1995)
28. Henry C.M. et al, *Plant Pathology* 41, pp. 483-489 20 (1992)
29. Grassi G. et al., *Phytopath. Medit.* 28, pp. 131-139 (1989)
30. Merdinoglu D. et al., *Acad. Agric. Fr.* 79, n° 6, pp. 85-98 (1993)
- 25 31. Scolten O.E. et al., *Archives of Virology* 136, pp. 349-361 (1994)
32. Büttenr G. & Bürcky K., *Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Braunschweig Germany, 30 August 21-24 (1990)
33. Whitney E.D., *Plant Disease* 73, pp. 287-289 (1989)

34. Powell A.P. et al., *Science* **232**, pp. 738-743 (1986)
35. Fritchen J.H. & Beachy R.N., *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, pp. 739-763 (1993)
36. Wilson T.M.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, pp. 3134-3141 (1993)
- 5
37. Gonsalves D. & Slightom J.L., *Seminars in Virology* **4**, pp. 397-405 (1993)
38. D'Halluin K. et al., *Biotechnology* **10**, pp. 309-314 (1992)
- 10
39. Kallerhof J. et al., *Plant Cell Reports* **9**, pp. 224-228 (1990)
40. Ehlers U. et al., *Theoretical and Applied Genetic* **81**, pp. 777-782 (1991)
41. Kraus J. et al., *Field performance of transgenic sugar beet plants expressing BNYVV coat protein plants, Fourth International Congress of Plant Molecular Biology, Int. Soc. for Plant Molecular Biology, Amsterdam* (1994)
- 15
42. Maiss E. et al., *Proceedings of the Third International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms, Monterey*, pp. 129-139 (1994)
- 20
43. Norris et al., *Plant Molecular Biology* **21**, pp. 895-906 (1993)

CLAIMS

1. Method for inducing resistance to a virus comprising a TGB3 sequence with the proviso that it is not the potato virus X, into a plant cell or a plant,  
5 comprising the following steps :

- preparing a nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence corresponding to at least 70% of the nucleic acid sequence of TGB3 of said virus or its  
10 corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant,
- transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and possibly
- regenerating a transgenic plant from the transformed  
15 plant cell.

2. Method according to the claim 1, characterized in that the nucleic acid sequence of the nucleic acid construct corresponds to at least 90% of the nucleic acid sequence of TGB3 of said virus or its  
20 complementary cDNA.

3. Method according to the claim 1 or 2, characterized in that the virus is selected from the group consisting of the apple stem pitting virus, the blueberry scorch virus, the potato virus M, the white clover mosaic  
25 virus, the *Cymbidium* mosaic virus, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

4. Method according to any of the preceding claims, characterized in that the plant cell is a stomatal  
30 cell.

5. Method according to any of the preceding claims, characterized in that the plant is selected from

the group consisting of apple, blueberry, potato, clover, orchid, barley or peanut.

6. Method according to claim 1 or 2, characterized in that the virus is BNYVV, the nucleic acid  
5 sequence of TGB3 of said virus is comprised between the nucleotide 3627 and 4025 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of the BNYVV and the plant is a beet, preferably a sugar beet (*Beta vulgaris*).

7. Method according to any of the preceding  
10 claims, characterized in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence or a terminator sequence active in a plant.

8. Method according to claim 7 characterized in that the promoter sequence is a constitutive or a  
15 foreigner vegetal promoter sequence.

9. Method according to the preceding claim 7, characterized in that the promoter sequence is selected from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter, and/or the polyubiquitin *Arabidopsis thaliana*  
20 promoter.

10. Method according to any of the claim 7 to 9, characterized in that the promoter sequence is a promoter which is mainly active in the root tissue of plants such as the par promoter of the haemoglobin gene  
25 from *Perosponia andersonii*.

11. Transgenic plant resistant to a virus with the proviso that it is not the potato virus X, comprising a nucleic acid construct having a nucleic acid sequence corresponding to at least 70% of the nucleic acid  
30 sequence of TGB3 of said virus or its corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant.



12. Transgenic plant according to the claim 11, characterized in that the nucleic acid construct has a nucleic acid sequence corresponding to at least 90% of the nucleic acid sequence of TGB3 of said virus or its  
5 complementary cDNA.

13. Transgenic plant according to the claim 11 or 12, characterized in that the virus is selected from the group consisting of the apple stem pitting virus, the blueberry scorch virus, the potato virus M, the white  
10 clover mosaic virus, the *Cymbidium* mosaic virus, the potato virus X, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

14. Transgenic plant according to the claims  
15 11 to 13 being a plant selected from the group consisting of apple, blueberry, potato, clover, orchid, barley or peanut.

15. Transgenic plant according to the claims 11 or 12, characterized in that the transgenic plant being  
20 a beet, preferably a sugar beet (*Beta vulgaris*) the virus is BNYVV and the nucleic acid sequence of TGB3 of said virus is comprised between the nucleotide 3627 and 4025 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of BNYVV or its corresponding cDNA.

25 16. Transgenic plant according to any of the preceding claims 11 to 15, characterized in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence and a terminator sequence active in a plant.

17. Transgenic plant according to any of the  
30 preceding claims 11 to 16, characterized in that the regulatory sequence(s) comprise a promoter sequence which is a constitutive or a foreigner vegetal promoter sequence.

18. Transgenic plant according to the claim 17, characterized in that promoter sequence is selected from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter, and/or the polyubiquitin *Arabidopsis thaliana* promoter.

19. Transgenic plant according to claim 17 or 18 characterized in that the promoter sequence is a promoter which is mainly active in root tissues such as the par promoter of the haemoglobin gene from *Perosponia andersonii*.

20. Transgenic plant tissue selected from the group consisting of fruit, stem, root, tuber, seed of a plant according to any of the preceding claims 11 to 19.

21. Reproducible structure obtained from a transgenic plant according to any of the preceding claims 11 to 19.

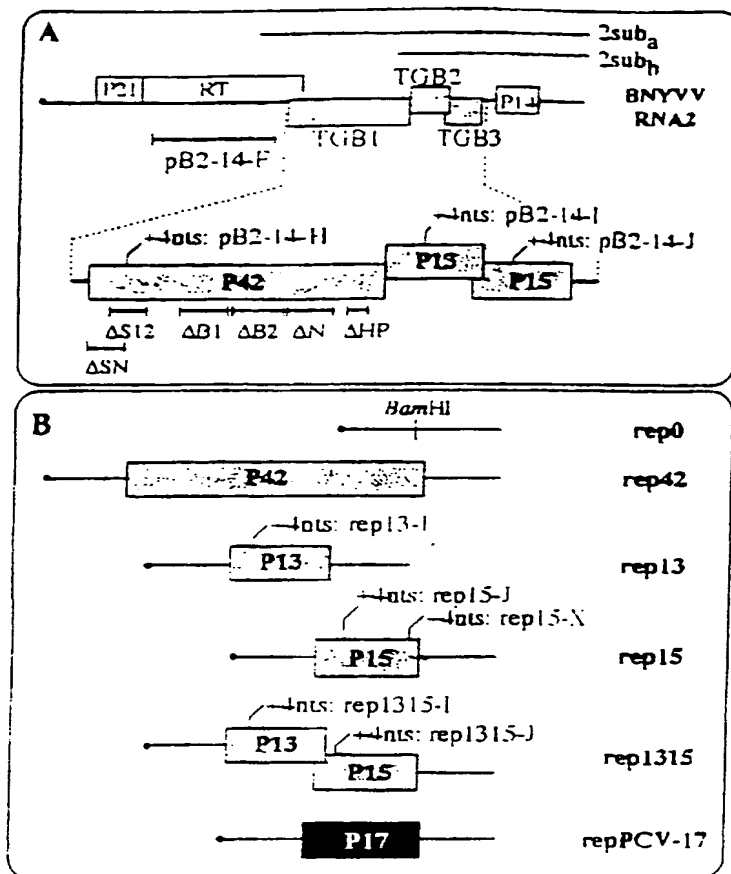


FIG. 1

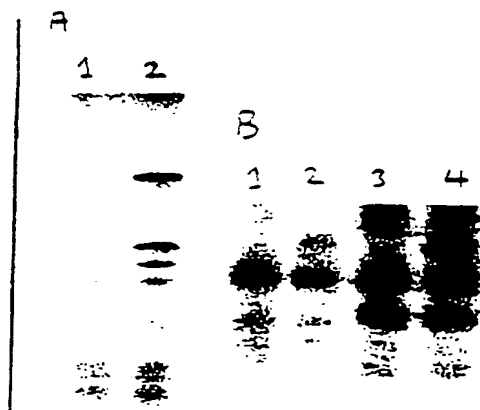


FIG. 2

2/5

FIG. 3

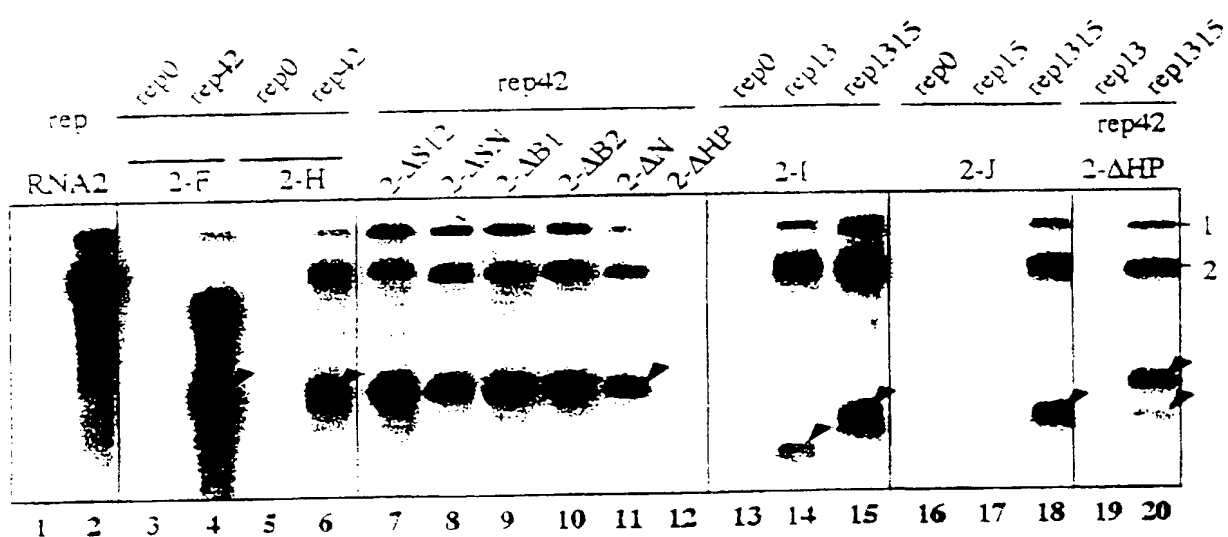
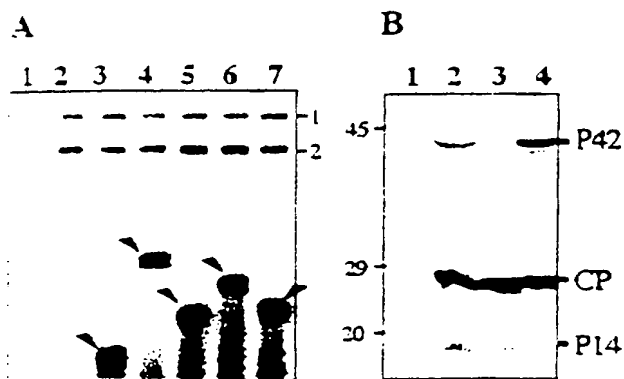


FIG. 4

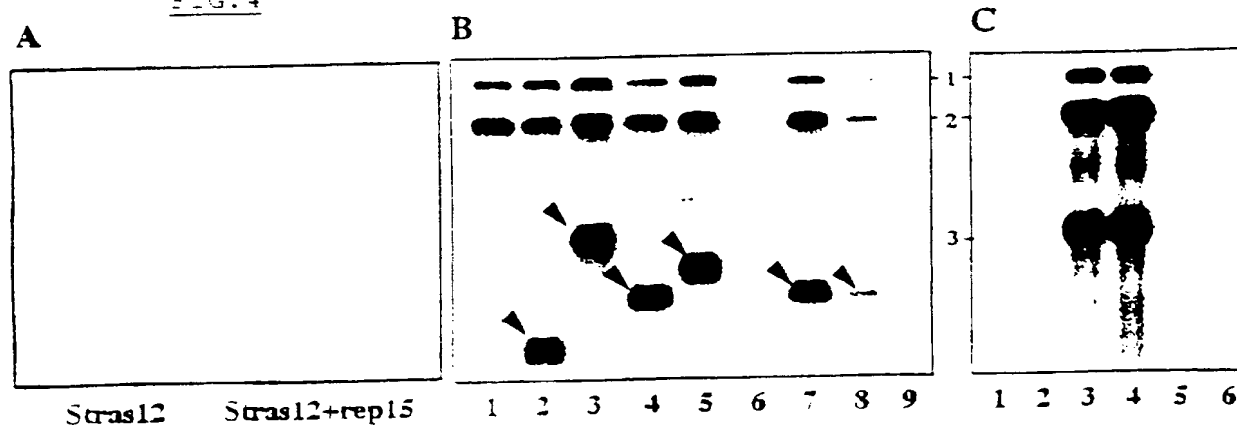


FIG. 5

1/1  
ATG GTG CTT GTG GTT AAA GTA GAT TTA TCT AAT ATT GGA TTG TAC ATA GTT GGC GGT TGT  
M V L V V K V D L S N I V L Y I V A G C  
61/21  
GTT GTT GTC AGT ATG TTG TAC TCA CCG TTT TTC AGC AAC GAT GTT AAA GCG TCC AGC TAT  
V V V S M L Y S P P P S N D V K A S S Y  
121/41  
GGG GGA GCA ATT TTT AAG GGG AGC GGC TGT ATC ATG GAC AGG AAT TCG TTT GCT CAA TTT  
A G A I P K G S G C I M D R N S P A Q P  
181/61  
GGG AGT TGC GAT ATT CCA AAG CAT GTA GCG GAG TCC ATC ACT AAG GTT GCG ACC AAA GAG  
G S C D I P K E Y A E S I T K V A T K E  
241/81  
CAC GAT GTT GAC ATA ATG GTA AAA AGG GGT GAA GTG ACC GTT CGT GTT GTG ACT CTC ACC  
E D V D I M V K R G E V T V R V V T L T  
301/101  
GAA ACT ATT TTT ATA ATA TTA TCT AGA TTG TTT GGT TTG GCG GTG TTT TTG TTC ATG ATA  
E T I P I I L S R L P G L A V P L P M I  
361/121  
TGT TTA ATG TCT ATA GTT TGG TTT TGG TAT CAT AGA TAA  
C L M S I V W P W Y E R \*

FIG. 6SEQ ID NO. 1

4/5

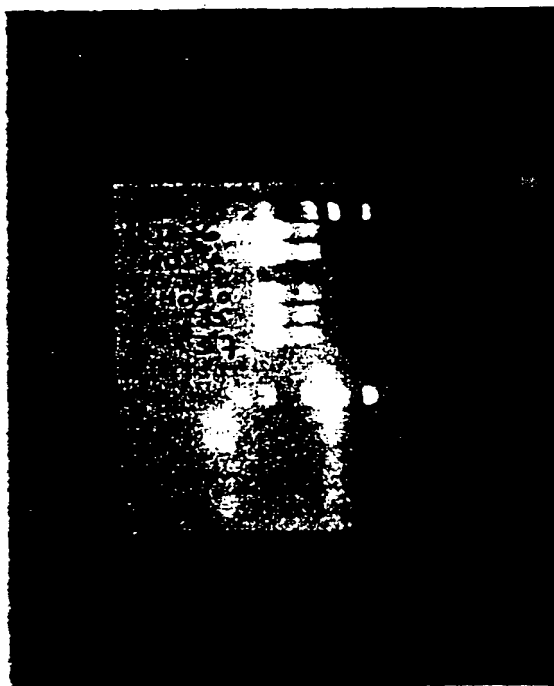
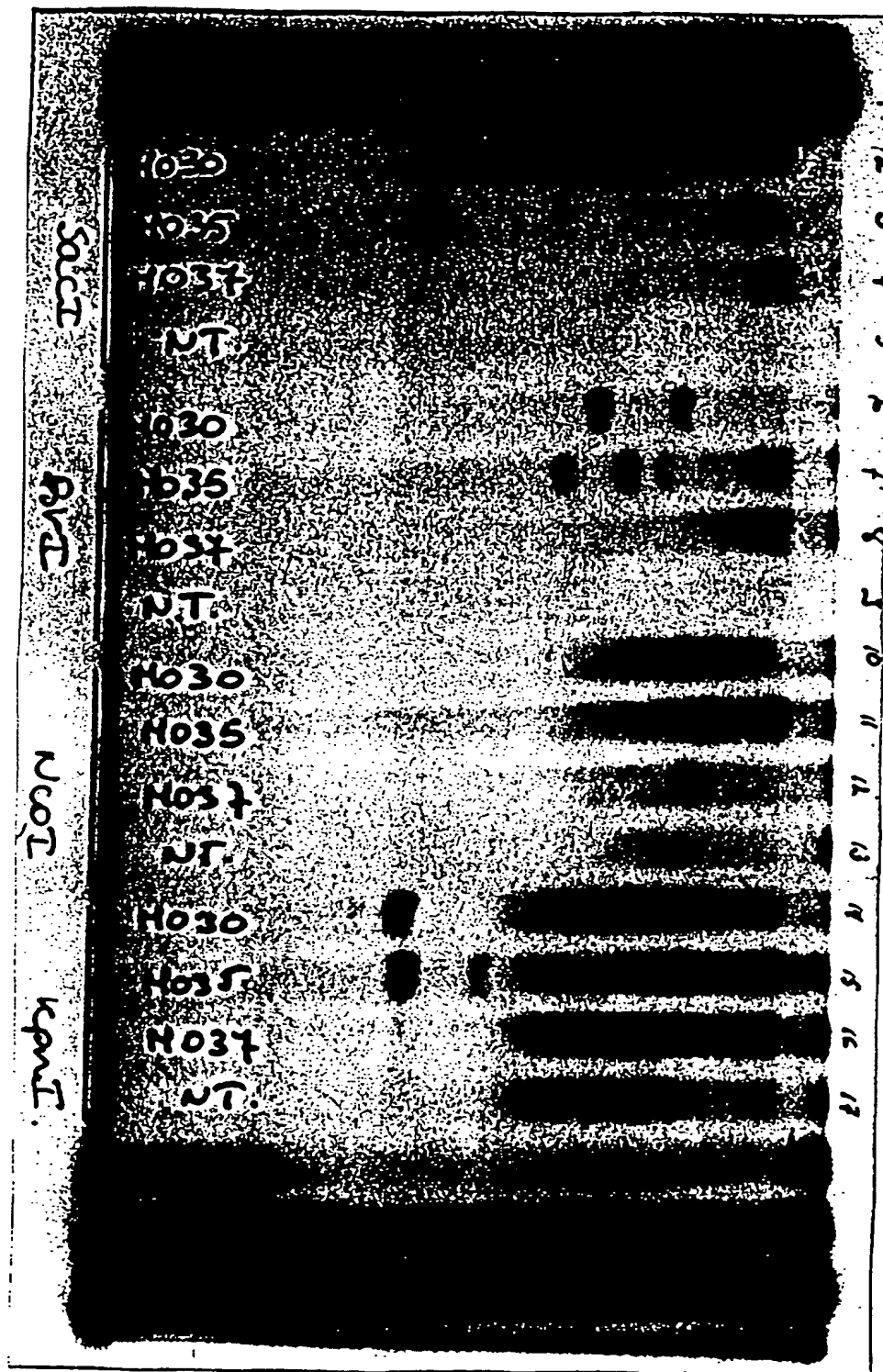


FIG. 7

FIG. 8



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/BE 97/00092

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 A01H5/00 //C07K14/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H. XU ET AL.: "Genetically engineered resistance to potato virus X in four commercial potato cultivars" PLANT CELL REP., vol. 15, 1995, pages 91-96, XP000617900 see abstract and page 95. ---	1,11
A	WO 91 13159 A (BIOSEM) 5 September 1991 cited in the application see Examples 15-18 and claims. --- -/-	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 1997

Date of mailing of the international search report

16.12.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Yeats, S



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/BE 97/00092

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D.L. BECK ET AL.: "Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, 1994, pages 10310-10314, XP002025561 see abstract.	1
A	--- D. GILMER ET AL.: "Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2" VIROLOGY, vol. 189, 1992, pages 40-47, XP002025562 cited in the application see abstract and Figure 1. -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Original Application No

PCT/BE 97/00092

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9113159 A	05-09-91	FR 2658987 A	06-09-91
		FR 2658988 A	06-09-91
		AT 129745 T	15-11-95
		DE 69114275 D	07-12-95
		DE 69114275 T	13-06-96
		EP 0517833 A	16-12-92
		ES 2079647 T	16-01-96
-----			

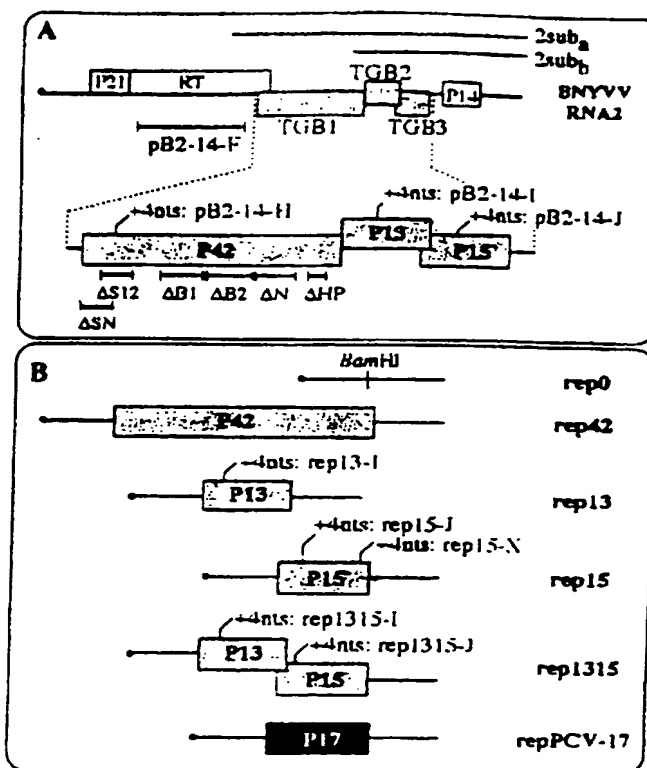
## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : <b>C12N 15/82, A01H 5/00 // C07K 14/08</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 98/07875</b>
			(43) International Publication Date: 26 February 1998 (26.02.98)
(21) International Application Number: <b>PCT/BE97/00092</b>		(74) Agents: VAN MALDEREN, Eric et al.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Brussels (BE).	
(22) International Filing Date: 18 August 1997 (18.08.97)			
(30) Priority Data: 96870106.0 19 August 1996 (19.08.96) EP (34) Countries for which the regional or international application was filed: BE et al.		(81) Designated States: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE (Utility model), EE, GF, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Applicant (for all designated States except US): SES EUROPE N.V./S.A. [BE/BE]; Industriepark 15, B-3300 Tienen (BE).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): GUILLEY, Hubert [FR/FR]; 32, rue de l'Herbe, F-67370 Berstett (FR). JONAR, Gérard [FR/FR]; 9, quai de Chanoine Winterer, F-67000 Strasbourg (FR). RICHARDS, Ken [FR/FR]; 2, rue Principale, F-67370 Pfulgriesheim (FR). BOUZOUBAA, Salah [FR/FR]; 11, rue de Berstett, F-67200 Strasbourg (FR). BLEYKASTEN-GROSSHANS, Claudine [FR/FR]; 9, rue du Renard Préchant, F-67000 Strasbourg (FR). WEYENS, Guy [BE/BE]; Dwarsbos 25, B-1650 Beersel (BE). LEFEBVRE, Marc [BE/BE]; Rue de la Chapelle Stevenaert, 75, B-1370 Jodoigne (BE).		Published With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.	

(54) Title: METHOD FOR INDUCING VIRAL RESISTANCE INTO A PLANT

## (57) Abstract

The present invention concerns a method for inducing resistance to a virus comprising a TGB3 sequence with the proviso that it is not the potato virus X, into a cell plant or a plant, comprising the following steps: preparing a nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence corresponding to at least 70 % of the nucleic acid sequence of TGB3 of said virus or its corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant, transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and possibly regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell. The present invention is also related to the plant obtained.



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece		Republic of Macedonia	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

5

METHOD FOR INDUCING VIRAL RESISTANCE INTO A PLANT

10

Field of the invention

The present invention is related to a method for inducing viral resistance into a cell and plant, especially BNYVV-resistance into a sugar beet cell and  
15 plant and the viral resistant cell and plant obtained.

Background of the invention and state of the art

The widespread viral disease of the sugar beet plant (Beta vulgaris) called Rhizomania is caused by a furovirus, the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) (23,  
20 24) which is transmitted to the root of the beet by the soilborne fungus Polymyxa betae (25).

The disease affects significantly acreages of the area where the sugar beet plant is grown for industrial  
25 use in Europe, USA and Japan and is still in extension in several places in Western Europe (26, 27). As there exists no practical method to effectively control the spread of the virus at a large scale by chemical or physical means (28), neither in the plants nor in the soil, the main focus  
30 has been to identify natural sources of resistance within the sugar beet germplasm and to develop by breeding, varieties of sugar plants beet expressing the resistance

genes. A variety of such tolerance genes to the virus has been identified and, some have been successfully used in the breeding of commercial sugar beet varieties (29, 30, 31).

5                   Only the use of BNYVV-resistant or tolerant varieties will enable farmers to grow sugar beet plants in BNYVV-infected areas where sugar beet plant is an essential component of the crop rotation and contributes significantly to the grower's income.

10                   A number of detailed studies have shown that a difference in susceptibility to the BNYVV-infection among sugar beet genotypes or varieties, generally reflect difference in the diffusion or translocation of the virus in the root tissues (32).

15                   However, there are still few reports which indicate clearly that the tolerance genes, even from differing sources of sugar beet germplasm or wild relatives germplasm (33), would provide distinct mechanisms of resistance. Such a situation would represent a more  
20 manageable situation to design long lasting BNYVV-resistance strategies.

                  Since 1986, number of reports and publications have described the use of isolated viral gene sequences expressed in plant to confer a high level of  
25 tolerance against the virus or even to confer a broad spectrum type of resistance against a number of related viruses (34, 35, 36). One of the most documented viral resistance strategy based on genetic engineering, in many cultivated species such as potato, squash, cucumber or  
30 tomato, is the use of the viral gene sequence encoding the coat-protein of the target virus (37) which under the control of plant regulatory elements, will be expressed in

the plant.

However in the case of the coat-protein mediated resistance, the expression of a certain level of resistance in the transgenic plant might be attributed to  
5 different mechanisms such as RNA co-suppression and not necessarily to the production of the protein sequence.

In general, the virus sequence will be transformed in an appropriated cell or a tissue culture of the plant species using an Agrobacterium mediated  
10 transformation system or a direct gene transfer method according to the constraints of the tissue culture or cell culture method which can be successfully applied in a given species. A whole plant will be regenerated and the expression of the transgene will be characterized.

15 Though sugar beet is known as a recalcitrant species in cell culture, limiting the extent of practical genetic engineering applications in that species, there are number of isolated reports of successful transformation and regeneration of whole plants (38). A few examples of  
20 engineering tolerance to the BNYVV by transforming and expressing the BNYVV coat-protein sequence in the sugar beet genome have also been published (39, WO91/13159) though they rarely report data on whole functional transgenic sugar beet plants (40). In particular, reports  
25 show limited data on the level of resistance observed in infected conditions with transgenic sugar beet plants transformed with a gene encoding a BNYVV coat-protein sequence (41, 42).

A complete technology package including a  
30 sugar beet transformation method and the use of the expression of the BNYVV coat-protein sequence as resistance source in the transgenic sugar beet plant obtained by said

transformation method has been described in the Patent Application WO91/13159.

Based on the information published, it can not be concluded that the coat-protein mediated resistance mechanism provides any potential for conferring to the sugar beet plant a total immunity to the BNYVV-infection by inhibiting completely the virus multiplication and diffusion mechanisms. To identify a resistance mechanism which enables to block significantly the spread of the virus at the early stage of the infection process would be a major criteria of success to develop such a transgenic resistance, in addition to the fact that even a level of resistance comparable to those known from the genes of resistance identified within the sugar beet germplasm would diversify the mechanisms of resistance available.

Because the disease is shown to expand in many countries or areas, at a speed depending upon the combination of numerous local environmental and agricultural factors, there is a major interest to diversify the sources of genetic resistance mechanisms which may, alone or in combination, confer a stable and long lasting resistance strategy in the current and future varieties of sugar beet plants which are grown for industrial use.

The publication of Xu H. et al. (Plant Cell Report, Vol. 15, pp. 91-96 (1995)) describes genetically engineering resistance construct to potato virus X in four commercial potato cultivars. However, said document states that transgenic potato clones which have included the 8KG gene (the TGB3 construct). However, when these transgenic plants were challenged with PVX, there was no protection against PVX suggesting that the OK protein does not play a



role in the protection against PVX.

#### Aims of the invention

The present invention aims to provide a new  
5 method for introducing various viral resistances into a cell and a plant and the viral resistant cell and plant obtained.

A main aim of the invention is to provide a new method for introducing BNYVV resistance into a cell and  
10 a plant and the BNYVV-resistant cell and plant, in particular a sugar beet cell and plant (Beta vulgaris ssp.), obtained.

#### Summary of the invention

15 The present invention provides the use of an alternative sequence of plant virus, especially the BNYVV, to obtain a high degree of tolerance to the viral infection, in particular to ensure a rapid and total blocking of virus multiplication and diffusion mechanisms  
20 in a plant, especially in the sugar beet plant (Beta vulgaris), including fodder beet, Swiss Whard and table beet, which may also be subject to this viral infection. Expression of the resistance will be obtained in transgenic cell and plant, especially sugar beet cells and plants  
25 produced by the transformation method subject to the Patent Application WO95/10178 or by other transformation methods based on Agrobacterium tumefaciens or direct gene transfer. Because of its high efficiency, the transformation method as described in WO95/10178 enables the production of large  
30 numbers of transformed plants, especially sugar beet plants, and will be preferred to develop transgenic plants which may be analysed and characterized for their level of

viral resistance, especially BNYVV Resistance, including their field evaluation.

The genome of beet necrotic yellow vein furovirus (BNYVV) consists of five plus-sense RNAs, two of which (RNAs 1 and 2) encode functions essential for infection of all plants while the other three (RNAs 3, 4 and 5) are implicated in vector-mediated infection of sugar beet (Beta vulgaris) roots (1). Cell-to-cell movement of BNYVV is governed by a set of three successive, slightly overlapping viral genes on RNA 2 known as the triple gene block (TGB) (2), which encode, in order, the viral proteins P42, P13 and P15 (gene products are designated by their calculated  $M_r$  in kilodalton (3)).

In the following description, the TGB genes and the corresponding proteins will be identified by the following terms : TGB1, TGB2, TGB3 or by their encoded viral protein number P42, P13 and P15. TGB counterparts are present in other furoviruses (4, 5), and in potex-, carla- and hordeiviruses (6).

In the table 1 are represented viruses having a TGB3 sequence, the molecular weight of TGB3 of said viruses, their host and references.

Table 1

Virus	Size of TGB3	Host	Reference
Apple stem pitting virus	8 kDa	apple	Jelkman, J. Gen. Virol. 75, 1535-1542 (1994)
Blueberry scorch virus	7 kDa	blueberr y	Cavileer et al., J. Gen. Virol. 75, 711-720 (1994)
Potato virus M	7 kDa	potato	Zavriev et al., J. Gen. Virol. 72, 9-14 (1991)
White clover mosaic virus	8 kDa	clover	Forster et al., Nucl. Acids Res. 16, 291-303 (1988)
Cymbidium mosaic virus	10 kDa	orchid	Neo et al., Plant Mol. Biol. 18, 1027-1029 (1992)
Barley stripe mosaic virus	17 kDa	barley	Gustafson et al., Nucl. Acids Res. 14, 3895-3909 (1986)
Potato mop top virus	21 kDa	potato	Scott et al., J. Gen. Virol. 75, 3561-3568 (1994)
Peanut clump virus	17 kDa	peanut	Herzog et al., J. Gen. Virol. 75, 3147-3155 (1994)
Beet soil-borne virus	22 kDa	sugar beet	Koenig et al., Virology 216, 202-207 (1996)

The Inventors propose herewith a new method for providing resistance to plant viruses into a plant by

5 blocking virus multiplication and diffusion mechanisms into

said plant, especially into its root tissue. In order to demonstrate said resistance, the Inventors describe hereafter the effect of the overexpression of TGB sequences alone or in combination upon BNYVV multiplication and  
5 diffusion mechanism in plants of C. quinoa which are also the hosts of the BNYVV virus and which could be more easily manipulated by the man skilled in the art.

The Inventors have also made experiments upon Beta macrocarpa. These results have shown that it will be  
10 possible to obtain also the transformation of plants by the method according to the invention and obtain expression of TGB3 gene by said plants. Therefore, as explained in the following description, said method could be used to obtain various viral resistances into various plants species  
15 subject to infection by viruses characterized by the presence of a TGB3 sequence in their genome.

It is known that BNYVV does not require synthesis of viral coat protein for production of local lesions on leaves of hosts such as Chenopodium quinoa (7),  
20 indicating that virion formation is not required for cell-to-cell movement.

However, the manner in which the TGB components assist in the movement process is not understood although computer-assisted sequence comparisons have  
25 detected characteristic conserved sequences which may provide clues to their function. Thus, the 5'-proximal TGB protein (TGB1) invariably contains a series of sequence motifs characteristic of an ATP/GTP-binding helicase while the ~~second~~ second protein (TGB2) always has two potentially  
30 membrane-spanning hydrophobic domains separated by a hydrophilic sequence which contains a highly conserved peptide motif of unknown significance (6). The sequence and

size of the third TGB protein (TGB3) is more variable although the N-terminal portion is generally rather hydrophobic. Subgenomic RNAs with 5'-termini mapping upstream of the BNYVV TGB1 and TGB2 open reading frames 5 (ORFs) have been detected (Figure 1) but no such species has been reported for TGB3 of BNYVV (2), or of any other of the TGB-containing viruses. In the case of potato virus X (PVX; ref 8) and barley stripe mosaic virus (BSMV; ref. 9), there is evidence that the TGB2 and TGB3 products are 10 expressed from the same subgenomic RNA.

So far, no example has been reported of a virus in which the three TGB members are arranged differently on the same RNA or are parcelled out to different genome RNAs, suggesting that their association in 15 a particular order might be important in regulating their function.

The present invention concerns a method for inducing viral resistance to a virus comprising a triple gene block (TGB) with the proviso that it is not the potato 20 virus X. Said virus is preferably selected from the group consisting of the apple stem pitting virus, the blueberry scorch virus, the potato virus M, the white clover mosaic virus, the *Cymbidium* mosaic virus; the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and 25 the beet soil-borne virus; said method comprises the following steps :

- preparing a nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence corresponding to at least 70% of the nucleic acid sequence of TGB3 of said virus or its 30 corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant,

- transforming a plant cell with the nucleic acid construct, and possibly
- regenerating the transgenic plant from the transformed plant cell.

5                    Preferably, the plant is a plant which may be infected by the above-described virus and is preferably selected from the group consisting of apple, blueberry, potato, clover, orchid, barley, peanut and sugar beet.

10                   The present invention concerns also the obtained plant cell and transgenic (or transformed) plant (made of said plant cells) resistant to said viruses and comprising said nucleic acid construct.

15                   The Inventors have also discovered unexpectedly that it is possible to induce BNYPV-resistance into a plant by a method which comprises the following steps :

- preparing a nucleic acid construct comprising a nucleic acid sequence corresponding to at least 70%, preferably at least 90%, of the nucleic acid sequence of comprised  
20                   between the nucleotides 3627 and 4025 of the 5' strand of the genomic or subgenomic RNA 2 of the BNYPV or its corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant,
- transforming a plant cell with said construct, and  
25                   possibly
- regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell.

30                   The nucleic acid sequence comprised between the nucleotides 3627 and 4025 of the 5' strand of the genomic or subgenomic RNA 2 encoding the P15 protein is described in the figure 6 and in the publication (3). Said nucleic acid sequence and the corresponding amino acid

sequence are described in the following specification as SEQ ID NO. 1.

Another aspect of the present invention concerns a plant cell and a transgenic plant (made of said  
5 plant cells) resistant to BNYVV and comprising a nucleic acid construct having a nucleic acid sequence corresponding to at least 70%, preferably at least 90%, to the nucleic acid sequence comprised between the nucleotides 3627 and 4025 of the 5' strand of the genomic or subgenomic RNA 2 of  
10 BNYVV or the corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in the plant.

Preferably, said plant cell or transgenic plant (made of said plant cells) resistant to BNYVV is obtained by the method according to the invention.

15 The variants of the nucleic acid sequence described as SEQ ID NO. 1 comprise insertion, substitution or deletion of nucleotides encoding the same or different amino acid(s). Therefore, the present invention concerns also said variants of the nucleic acid sequence SEQ ID NO.  
20 1 which present more than 70% homology with said nucleic acid sequence and which are preferably able to hybridize to said nucleic acid sequence in stringent or non-stringent conditions.

Preferably, said sequences are also able to  
25 induce BNYVV resistance into a plant.

The terms "induce a viral resistance into a plant" mean inducing a possible reduction or a significative delay into the appearance of infection symptoms, virus multiplication or its diffusion mechanisms  
30 into the plant, especially in the root tissue.

The regulatory sequence(s) of said nucleic acid sequence are promoter sequence(s) and terminator

sequence(s) active into a plant.

The nucleic acid construct may also include a selectable marker gene, which could be used to identify the transformed cell or plant and express the nucleic acid  
5 construct according to the invention.

Preferably, the cell is a stomatal cell and the plant is a sugar beet (Beta vulgaris ssp.) made of said cells.

According to the invention, the promoter  
10 sequence is a constitutive or foreigner vegetal promoter sequence, preferably selected from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter sequence, polyubiquitin Arabidopsis thaliana promoter (43), a promoter which is mainly active in root tissues such as the  
15 par promoter of the haemoglobin gene from Perosponia andersonii (Landsman et al. Mol. Gen. Genet. 214 : 68-73 (1988)) or a mixture thereof.

A last aspect of the present invention is related to a transgenic plant tissue such as fruit, stem,  
20 root, tuber, seed of the transgenic plant according to the invention or a reproducible structure (preferably selected from the group consisting of calluses, buds or embryos) obtained from the transgenic plant or the cell according to the invention.

25 The techniques of plant transformation, tissue culture and regeneration used in the method according to the invention are the ones well known by the person skilled in the art. Such techniques are preferably the ones described in the International Patent Applications  
30 WO95/10178 or WO91/13159 corresponding to the European Patent Application EP-B-0517833, which are incorporated herein by reference. These techniques are preferably used



for the preparation of transgenic sugar beets according to the invention.

#### Brief description of the drawings

- 5 The figure 1 represents Structure of wild-type BNYVV RNA 2 and of replicons expressing TGB proteins.
- The figure 2 represents the *In vitro* translation of the replicons of the TGB genes in wheat germ extract.
- 10 The figure 3 represents the amplification of the replicons encoding the TGB proteins in *Chenopodium quinoa* protoplasts and expression of P42.
- The figure 4 represents the complementation of RNA 2 transcripts containing defects in the different TGB genes by the corresponding
- 15 wild-type gene supplied from a replicon.
- The figure 5 shows the effect of replicons on infection with wild-type BNYVV RNAs 1 and 2.
- The figure 6 represents the nucleotides and amino acid sequence of TGB3 encoding the P15 of BNYVV.
- 20 The figure 7 shows the presence of the coding regions of the BNYVV p15 gene in the sugar beet genome by a PCR.
- The figure 8 shows the integration of the BNYVV P15 gene
- 25 in the sugar beet genome by Southern blot hybridisation.

#### Description of the invention

- In order to identify the potential use of
- 30 particular gene sequences isolated from the viral RNA2 of BNYVV and to create BNYVV-resistance in a sugar beet via plant transformation, the Inventors have investigated

whether independent expressions of the BNYVV TGB protein is possible by inserting the ORF of each into a viral replication-dependant "replicon" derived from BNYVV RNA3. The Inventors have showed that in mixed infections of C. quinoa leaves, the BNYVV TGB1 or TGB2 protein so expressed can complement BNYVV RNA 2 containing a mutation disabling the corresponding TGB protein. No complementation was observed with a replicon containing TGB3, however, unless the TGB3 ORF was positioned downstream of the ORF for TGB2 in the replicon. When co-inoculated with wild-type RNAs 1 and 2, the replicon expressing the TGB3 ORF of BNYVV inhibited infection. The data are consistent with a model for expression of the TGB proteins in which translation of P15 from a dicistronic subgenomic RNA regulates P15 expression levels in vivo. The Inventors have also identified that high expression of P15 could ensure a rapid and total blocking of virus multiplication and diffusion mechanisms in the plant.

## 20 MATERIALS AND METHODS

### cDNA clones

The transcription vector for production of wild-type full-length BNYVV RNA 1 and RNA 2 were pB15 (10) and pB2-14 (11), respectively. Transcription vectors for previously described RNA 2 mutants were pB2-14-F, -H, -I and -J (2) and pB2-14- $\Delta$ SN, - $\Delta$ S12, - $\Delta$ S37, - $\Delta$ B1, - $\Delta$ B2, - $\Delta$ B2, - $\Delta$ N and -GAA (11). The RNA 2 deletion mutant pB2-14- HP1 was produced by elimination of the sequence between nucleotides 3158 and 3258. The empty BNYVV RNA 3-derived replicon, rep0, was obtained by transcription of the RNA 3 deletion mutant pB35A $\Delta$ ES (12). TGB sequences for insertion into rep0 were amplified by the polymerase chain reaction

(PCR) using primers which each contained a non-templated *Bam*HI site at their 5'-extremity. PCR fragments corresponding to the P42 gene (nucleotides 2127-3297), the P13 gene (nucleotides 3282-3650), the P15 gene (nucleotides 3627-4025) and both the P13 and P15 genes (nucleotides 3282-4025) were digested with *Bam*HI and inserted into *Bam*HI-cleaved pB35AΔES. The resulting constructs were used to transcribe rep42, rep13, rep15, and rep1315, respectively. A replicon containing a frameshift mutation in the P15 ORF (Rep15-X) was produced by filling in the overhangs of an insert *Xba*I site (nucleotide 3948). The insert frameshift mutations in rep13-I, rep1315-I and rep15-J were created as described for the corresponding mutations in full-length RNA 2 (2). Cloned PCR-amplified sequences were verified to be error-free by sequencing (13).

#### In vitro transcripts

Capped transcripts were prepared by bacteriophage T7 polymerase run-off transcription (10) of plasmid DNA linearized by *Hind*III for pB15 and the replicon constructs and by *Sal*I for pB2-14 and related constructs. Transcript concentration and integrity were evaluated by agarose gel electrophoresis. Leaves were mechanically inoculated with 50  $\mu$ l per leaf of inoculation buffer containing 1  $\mu$ g of each transcript (2). In some experiments, the RNA 1 and 2 transcripts were replaced by 0.025  $\mu$ g of the highly infectious viral RNA purified from BNYVV isolate Stras 12 (10). Preliminary experiments showed that this amount of viral RNA was approximately equivalent in infectivity (as measured by a local lesion assay) to a mixture containing 1  $\mu$ g each of the RNA 1 and 2

transcripts. For protoplast infections, 0.5  $\mu$ g of viral RNAs 1 and 2 plus 3  $\mu$ g replicon transcript were inoculated to  $2.10^5$  protoplasts by electroporation (2).

Transcripts obtained from replicons were translated in a wheat germ extract (14) and the [ $^{35}$ S]-labelled translation products were visualized by autoradiography after SDS-PAGE (15, 16). Radioactivity incorporated into translation products was quantified with a Fujix MAS1000 BioAnalyzer and the values were adjusted for methionine content in calculating relative translation levels.

#### Detection of viral RNA and proteins

Total RNA was extracted (2) from inoculated leaves 10 days post-inoculation (pi) and from protoplasts 48 hr pi. Viral RNA was detected by northern hybridization with  $^{32}$ P-labelled antisense viral RNA transcripts (17) as probes. The RNA 1-specific probe was complementary to nucleotides 4740-5650, the RNA 2-specific probe to nucleotides 2324-3789 and the RNA 3-specific probe to nucleotides 1-380. P42, P14 and coat protein were detected by Western blot of total protein extracts of infected protoplasts using a rabbit polyclonal antiserum specific for each protein (18). The stability of mutations introduced into RNA 2 was tested by the polynucleotide chain reaction following reverse transcription (RT-PCR) of total RNA extracts from infected plants. Reverse transcripts were produced with an Expand<sup>TM</sup> reverse transcription kit (Boehringer) following the manufacturer's instructions. PCR was carried out essentially as described (19) using 25 cycles of the following regimen: 94 ° (30

sec), 50 ° (30 sec), 72 ° (3 min). Primer pairs for PCR amplification of different regions of the RNA 2 cDNA corresponded to (or were complementary to, in the case of the second member of each pair of primers) nucleotides 1143-1151 and 3393-3412 (P42 gene), and nucleotides 3151-3169 and 4128-4148 (P13 and P15 genes). The primer used to initiate cDNA synthesis prior to the PCR reactions was complementary to nucleotides 4128-4148.

## 10 RESULTS

### Replicons expressing the BNYVV TGB proteins

Provided that sufficient sequences at the 3'- and 5'-extremities are retained, a BNYVV RNA 3 transcript from which the central region has been deleted can replicate efficiently on C. quinoa leaves when coinoculated with RNAs 1 and 2, and can express a foreign gene inserted in place of the deleted sequence (12, 20). The Inventors have used such an RNA 3-based "replicon" to express each of the BNYVV TGB proteins out of their normal context in RNA 2 and tested the capacity of each replicon to complement an RNA 2 mutant defective in the corresponding TGB gene.

The replicons employed in this study are depicted in Figure 1. Figure 1 A is the Genome map of RNA 2. The TGB genes are shaded and lines above the map indicate the extents of the subgenomic RNAs 2sub<sub>a</sub> and 2sub<sub>b</sub>. The positions of deletions and frameshift-inducing insertions in RNA 2 are indicated. The 5'-terminal cap structure is denoted by a circle. P21 is the major viral coat protein. RT = readthrough domain (3). (B) BNYVV RNA 3-derived replicons containing the TGB genes of BNYVV (light shading) or the TGB3 gene encoding P17 of peanut clump

virus (PCV) (dark shading). The *Bam*HI site in the empty replicon (rep0) used for insertion of the PCR-amplified TGB sequences is shown. The positions of frameshift-inducing insertions in the various P13 and P15 mutant replicons are indicated. In addition to the constructs rep42, rep13 and rep15, which each contain a TGB gene, a fourth construct (rep1315) was produced containing both the P13 and P15 genes arranged in the same relative configuration as in RNA 2. The ability of each replicon to direct expression of the inserted gene or genes was tested by *in vitro* translation of the transcript in a wheat germ extract. The rep42, rep13 and rep15 transcripts each directed synthesis of an abundant product (Figure 2A, lane 2; Figure 2B, lanes 2 and 3), which was not produced in translations programmed with transcript corresponding to the empty replicon, rep0 (Figure 2A, lane 1; Figure 2B, lane 1). In the figure 2 (A), are represented  $S^{35}$ -methionine-labelled translation products of the empty replicon rep0 (lane 1) and rep42 (lane 2) displayed by autoradiography following PAGE (15). The indicated band was identified as P42 by comparison of its mobility to that of molecular weight markers (not shown). In the figure 2 (B), are represented translation products directed by rep0 (lane 1), rep13 (lane 2), rep15 (lane 3) and rep1315 (lane 4) displayed by autoradiography following PAGE (16). The bands tentatively identified as P13 and P15 are indicated to the right. The background band denoted by an asterisk was also synthesized when no transcript was introduced into the translation extract. The relative mobilities of the various translation products were as expected except that the putative P13 migrated slightly more slowly than P15, presumably because of its nontypical amino acid composition. The dicistronic

construct rep1315 directed synthesis of both P13 and P15 (Figure 2B, lane 4) in relative molar amounts of 3:1 (values corrected for the difference in methionine contents of the two proteins; if the N-terminal methionine of each protein is removed post-translationally, the molar ratio is 5:1).

The capacity of the replicons to be amplified by the viral replication machinery *in vivo* was tested by coinoculating replicon transcripts to *C. quinoa* protoplasts along with BNYVV RNA's 1 and 2. Northern blot analysis of total RNA extracted from the protoplasts 48 hr pi revealed that all the replicons containing the TGB genes were efficiently amplified (Figure 3A). The figure 3 (A) represents detection by northern hybridization of viral RNAs in *C. quinoa* protoplasts inoculated with BNYVV RNAs 1 and 2 alone (lane 2) or supplemented with rep0 (lane 3), rep42 (lane 4) rep13 (lane 5) rep1315 (lane 6) and rep15 (lane 7). RNA from mock-inoculated protoplasts was analyzed in lane 1. The protoplasts were harvested 48 hr pi and viral RNAs were detected using <sup>32</sup>P-labelled viral RNA-specific antisense RNA probes. The replicons are indicated by arrow heads. The figure 3 (B) represents Immunodetection of P42 in total protein extracts of *C. quinoa* protoplasts inoculated with BNYVV RNAs 1 and 2 (lane 2), transcript of wild-type RNA 1 plus transcript of the RNA 2 mutant pB2-14-H, which contains a frameshift mutation in the P42 gene (11) (lane 3), the RNA 1 and pB2-14-H transcripts plus rep42 (lane 4). Protein extracted from mock-inoculated protoplasts was analyzed in lane 1. After PAGE (15) and electrotransfer to nitrocellulose, P42, major viral coat protein (CP) and P14 were immunodetected with a mixture of antisera specific for each protein (18). The positions of

molecular weight standards are labelled in kilodaltons to the left of the blot. Western blot analysis revealed that the P42 level in protoplasts infected with a mixture of rep42 plus transcripts of RNA 1 and the frameshift mutant pB2-14-H, caused by filling in an *SpeI* site within the P42 gene of RNA 2 (see Figure 1), was about twice that in protoplasts infected with RNA 1 plus wild-type RNA 2 (Figure 3B, lanes 2 and 3). Note that the levels of accumulation of two other immunodetectable RNA 2 gene products (the major viral coat protein and P14; Figure 1) were not modified by the presence of rep42. P13 and P15 could not be immuno-detected in such experiments.

The BNYVV TGB proteins can be complemented in trans

The ability of the replicons containing the TGB genes to supply movement functions in whole plants was tested by coinoculating leaves of the local lesion host *C. quinoa* with one of a series of RNA 2 transcripts containing a mutation disabling a TGB gene plus a replicon containing the corresponding wild-type gene. In all experiments, the inoculum also contained transcript of wild-type RNA 1 as source of viral RNA-dependent RNA replicase, although this fact will not always be stated explicitly below. For the P42 gene, the RNA 2 mutants tested included the frameshift mutant (pB2-14-H) caused by filling in an *SpeI* site at nucleotide 2280, a series of mutants containing short in-frame deletions at different positions in the P42 ORF (mutants pB2-14- $\Delta$ S12, - $\Delta$ SN, - $\Delta$ B1, - $\Delta$ B2, - $\Delta$ N, and - $\Delta$ HPL; Figure 1A; also see ref. 11), and a deletion mutant (pB2-14-F; Figure 1) where removal of a 935 nucleotide sequence upstream of the P42 ORF has inactivated the promoter for the subgenomic RNA (RNA 2sub<sub>a</sub>) responsible for P42



synthesis. Inocula containing RNA 1 transcript plus any one of the above mutant RNA 2 transcripts did not produce local lesions on C. quinoa and no progeny viral RNA could be detected in the inoculated leaves 10 days pi (Figure 4, lanes 3 and 5; see ref. 11 for the other mutants). In the figure 4, the replicon indicated at the top of each lane was inoculated to leaves of 'C. quinoa together with wild-type RNA 1 transcript plus either wild-type RNA 2 transcript (lane 2) or the mutant RNA 2 transcript identified above each lane. In lanes 19 and 20 the inoculum contained rep42 and rep15 (lane 19) or rep42 and rep1315 (lane 20), in addition to RNA 1 and pB2-14- HP1 transcripts. Lane 1 contains RNA from a non-inoculated control plant. Inoculated leaves were harvested 10 days pi and tested for viral RNA contents by northern hybridization as described in Figure 3. The positions of replicons are indicated by arrows. When rep42 transcript was included in the inoculum, numerous local lesions (20-80 per leaf) appeared on the inoculated leaves except for the inoculum containing transcript of the RNA 2 deletion mutant pB2-14-HP1, which remained symptomless. The resulting pale green lesions were similar in appearance to those elicited by inoculation with RNA 1 plus wild-type RNA 2 except for the RNA 2 mutant pB2-14-F, where necrotic local lesions were formed. In this later case, the necrotic lesion phenotype may be related to production of a truncated form of the readthrough (RT) protein by this RNA 2 mutant (7).

Northern hybridization of the inoculated leaves 10 days pi revealed the presence of progeny viral RNAs of the length expected for RNAs 1, 2 and rep42 for all the RNA 2 mutants (Figure 4, lanes 2, 4, 7-11) except the deletion mutant pB2-14- HP1 (Figure 4, lane 13). As will be

shown below, the failure of pB2-14- $\Delta$ HP1 to be complemented by rep42 is probably due to deletion of the promoter for the subgenomic RNA (RNA 2sub<sub>B</sub>), which is believed to direct translation of the downstream TGB proteins.

5                    Similar complementation experiments were carried out with rep13, rep15 and the dicistronic construct rep1315. Both rep13 and rep1315 were able to complement accumulation on leaves (Fig 4, lanes 14 and 15) of the mutant pB2-14-I, in which the P13 gene had been disabled by  
10 insertion of four nucleotides (the insertion created an XhoI site), although the resulting local lesions were necrotic. Necrotic local lesions were also produced during mixed infections with the aforesaid replicons and wild-type RNA 1 and 2 (see below), indicating that the replicon-  
15 related symptom phenotype is dominant over the wild-type. The novel symptoms may be related to differences in the time course of synthesis or the level of accumulation of P13 when it is expressed from the replicon rather than full-length RNA 2.

20                    In experiments such as those described above, it is important to demonstrate that the mutation originally introduced into the P42 or P13 gene on the RNA 2 transcript was still present in the progeny RNA 2, that is, the defective copy of the TGB gene on the transcript had not  
25 been converted to the wild-type by RNA recombination in planta (21) with the copy present on the replicon. Therefore, an RT-PCR experiment was carried out on the progeny viral RNA from a plant infected with RNA 1, pB2-14-H transcript (P42 gene disrupted by filling in an SpeI  
30 site) and rep42. The primer pair used in the RT-PCR hybridized to RNA 2 sequences flanking the P42 gene and hence amplifies the copy of the gene present in RNA 2 but

not the copy on the replicon, where the flanking sequences are absent. Restriction enzyme analysis revealed that the *SpeI* site was absent in the resulting amplified DNA fragment, as expected for the mutated rather than the wild-type form of the TGB gene. Similar analysis of progeny viral RNA from plants infected with RNA 1, pB2-14-I (frameshift mutation in P13 gene creating an *XhoI* site) and either rep13 or rep1315 similarly demonstrated that the mutation disabling the copy of the P13 gene on the RNA 2 transcript was conserved in the progeny RNA 2. We conclude that rep42 and rep13 are indeed complementing P42 and P13 function by supplying the gene product *in trans* rather than simply serving as a source of the wild-type TGB sequence for recombination.

Unexpectedly, the replicon expressing the wild-type P15 gene (rep15) was unable to complement the P15-defective RNA 2 mutant pB2-14-J in mixed inoculations. No local lesions formed on the inoculated leaves 10 days pi and no viral RNA could be detected in the leaves by northern blot (Fig 4, lane 17). On the other hand, when pB2-14-J transcript was coinoculated with rep1315, local lesions (of the necrotic type) appeared and progeny viral RNAs were readily detected (Figure 4, lane 18). In this latter case, analysis of an RT-PCR product containing the P15 gene in the progeny RNA 2 revealed that the mutation disabling the gene was still present. Complementation of pB2-14-J still occurred when the P13 ORF in the dicistronic replicon was interrupted by a frameshift mutation (rep1315-I; Figure 1), establishing that expression of full-length P13 from the first ORF of the dicistronic replicon is not required for complementation by the downstream copy of the P15 gene.

Evidence that P15 is expressed from a dicistronic subgenomic RNA

An RNA 2-derived subgenomic RNA (RNA 2sub<sub>b</sub>) of about 1500 nucleotides length has been detected in  
5 BNYVV-infected tissue (2). The 5'-extremity of this species has not been mapped precisely but is predicted to lie near the 5'-terminus of the P13 ORF. No subgenomic RNA with 5'-end upstream of the P15 ORF has been detected, raising the possibility that, as in BSMV (8), P13 and P15 are both  
10 expressed from RNA 2sub<sub>b</sub>.

The aforementioned inability of rep42 to complement the P42-defective RNA 2 mutant pB2-14- HP1 could stem from polar effects of the RNA 2 deletion on synthesis of downstream TGB proteins if the deletion has disabled the  
15 RNA 2sub<sub>b</sub> promoter (The right-hand boundary of the deletion in pB2-14-ΔHP1 is only 30 residues upstream of the P13 initiation codon). To test this hypothesis, an experiment was carried out in which the pB2-14-ΔHP1 transcript was complemented with both rep42 and rep1315. Leaves inoculated  
20 with this mixture developed local lesions and contained progeny viral RNA's (Figure 4, lane 20). If, on the other hand, rep13 rather than rep1315 was used along with rep42 to complement pB2-24- HP1, no symptoms appeared and no progeny viral RNA's were detected by northern blot (Figure  
25 4, lane 19). These observations are consistent with the hypothesis that the pB2-14- HP1 deletion interferes with expression of the downstream TGB ORF's, presumably by blocking RNA 2sub<sub>b</sub> transcription. Furthermore, the fact that complementation was successful with rep1315 but not  
30 with rep13 indicates that P15 as well as P13 is translated from RNA 2sub<sub>b</sub>.

Independent expression of P15 inhibits infection with wild-type viral RNA

The ability of rep1315 but not rep15 to complement the P15-defective RNA 2 mutant pB2-14-J in leaf infections could indicate that independent expression of P15 from the monocistronic replicon interferes with the viral infection cycle by producing the gene product in excessive quantities relative to P13. To test this hypothesis, an experiment was carried out in which rep15 was inoculated to C. Quinoa leaves along with wild-type viral RNAs 1 and 2. No lesions appeared on the inoculated leaves, even at late times pi (Figure 5A), and no viral RNA could be detected by northern blot (Figure 5B, lane 6). The figure 5 (A) represents leaves of C. quinoa inoculated with RNAs 1 and 2 (left) or RNAs 1 and 2 plus rep15 (right). The leaves were photographed 20 days pi when the local lesions on the leaf to the left had expanded so as to cover much of the leaf surface. In the figure 5 (B), analysis by northern hybridization (as described in Figure 3) of the viral RNA contents of C. quinoa leaves inoculated with BNYVV RNAs 1 and 2 alone (lane 1) or together with rep0 (lane 2), rep42 (lane 3), rep13 (lane 4), rep1315 (lane 5), rep15 (lane 6), rep15-J (lane 7), rep15-X (lane 8) or repPCV-P17 (lane 9). The positions of replicons are indicated by arrows. (C) Analysis by northern hybridization of the viral RNA contents of the inoculated leaves (lanes 1, 3 and 5) and the roots (lanes 2, 4 and 6) of Beta macrocarpa either mock-inoculated (lanes 1 and 2), inoculated with BNYVV RNAs 1, 2 and 3 (lanes 3 and 4) or with RNAs 1, 2 and 3 plus rep15 (lanes 5 and 6). RNA 3 was included in the inoculum because it is necessary for systemic movement in B. macrocarpa (22). Under these conditions, leaves inoculated

with RNAs 1 and 2 alone were heavily infected (Figure 5A; Figure 5B, lane 2). The inhibition of virus infection by repl5 was dose-dependent. Addition of ten times less repl5 to the inoculum mix still resulted in almost complete inhibition of lesion formation but lesser amounts of the replicon were progressively less effective in blocking the infection. Repl5 also blocked the appearance of progeny viral RNA in the inoculated leaves and in the roots of Beta macrocarpa, a systemic host of BNYVV (Figure 5C, lanes 5 and 6). The empty replicon, rep0, and replicons expressing the other two TGB proteins (rep42, repl3, repl315), on the other hand, did not significantly inhibit BNYVV infection of C. guinoa leaves (Figure 5B, lanes 2-5).

Since repl5 did not interfere with amplification of RNA 1 and 2 in C. guinoa protoplasts (see Figure 3), this suggests that the replicon interferes with movement of the virus from the initial site of infection into neighbouring cells (cell-to-cell movement) during local lesion formation on leaves. Lesion formation was not inhibited by coinoculation of Stras 12 RNA with the replicons repl5-J or repl5-X (Figure 5B, lanes 7 and 8), which encode frameshift-truncated forms of P15. This finding confirms that expression of P15 from the replicon, rather than the simple presence of the corresponding RNA sequence, is required for inhibition during the mixed infection experiments. In the presence of repl5-X, however, the resulting local lesions were about one third the diameter of the lesions formed by infection with Stras 12 alone or with Stras 12 plus repl5-J and the content of progeny viral RNA in the infected leaves was significantly lower (Figure 5B, lane 8). This finding suggests that the almost full-length P15 molecule produced by repl5-X,

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>7</sup> :</b>  <b>C12N</b>	<b>A2</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 00/55301</b>  <b>(43) International Publication Date:</b> 21 September 2000 (21.09.00)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/EP00/02176  <b>(22) International Filing Date:</b> 7 March 2000 (07.03.00)  <b>(30) Priority Data:</b> 99200773.2      12 March 1999 (12.03.99)      EP  <b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).  <b>(72) Inventors; and</b> <b>(75) Inventors/Applicants (for US only):</b> JONARD, Gérard [FR/FR]; 12, rue du Général Zimmer, F-67084 Strasbourg Cedex (FR). LAUBER, Emmanuelle [FR/FR]; 34, rue de Rotterdam, F-67000 Strasbourg (FR). GUILLEY, Hubert [FR/FR]; 32, rue de l'Herbe, F-67370 Berstett (FR). RICHARDS, Kenneth [FR/FR]; 2a, rue Principale, F-67570 Pfulgriesheim (FR).  <b>(74) Agents:</b> VAN MALDEREN, Joëlle et al.; Office Van Malderen, 6/1, place Reine Fabiola, B-1083 Brussels (BE).		<b>(81) Designated States:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR INDUCING VIRAL RESISTANCE INTO A PLANT   <p>3287 ATGTCCTAGGCAAATAACCGCTCGACCCAATAAGAATGTGCCTATTGTTGTTGGTGTGTTGT M S R E I T A R P N K N V P I V V G V C -</p> <p>3347 GTTGTTGGCTTTCTTTGTATTGCTGGCGTTCATGCAGCAAAAACATAAGACACATTCTGGG V V A F F V L L A F M Q Q K H K T H S G -</p> <p>3407 GGTGATTACGGAGTCCCAACATTTTCTAACGGTGGTATATATAGAGACGGTACAAGATCA G D Y G V P T F S N G G I Y R D G T R S -</p> <p>3467 GCTGATTTTAATAGTAACAATCATCGTCTTACGGGTGCGGTGGGCTGGGGGTAGCGTT A D F N S N N H R A Y G C G G S G G S V -</p> <p>3527 AGTAGTCGAGTTGGGCAGCAACTTATTGTGTTAGCTATTGTTTCTGTGTTAATAGTGTCA S S R V G Q Q L I V L A I V S V L I V S -</p> <p>3587 CTATTACAACGATTAAAGGCTCCACCAGAACACATTTGTAATGGTGTGTTGTTAA 3643 L L Q R L R S P P E H I C N G A C G *</p>		
<b>(57) Abstract</b>  <p>The present invention concerns a method for inducing resistance to a virus comprising a TGB2 sequence into a cell plant or a plant, comprising the following steps: preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide sequence corresponding to at least 70 % of the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant, transforming a plant cell with the nucleotide construct, and possibly regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell. The present invention is also related to the plant obtained.</p>		





*FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY*

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



5

METHOD FOR INDUCING VIRAL RESISTANCE INTO A PLANT

10

Field of the invention

The present invention is related to a method for inducing viral resistance into a cell and a plant, especially BNYVV-resistance into a sugar beet cell and  
15 plant.

Background of the invention and state of the art

The widespread viral disease of the sugar beet plant (Beta vulgaris) called Rhizomania is caused by a  
20 benyvirus, the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) (23, 24) which is transmitted to the root of the beet by the soilborne fungus Polymyxa betae (25).

The disease significantly affects acreages where the sugar beet plant is grown for industrial use in  
25 Europe, USA and Japan and is still in extension in several places in Western Europe (26, 27). As there exists no practical method to effectively control the spread of the virus at a large scale by chemical or physical means (28), neither in the plants nor in the soil, the main focus has  
30 been to identify natural sources of resistance within the sugar beet germplasm and to develop by breeding, varieties of sugar beet plants expressing the resistance genes. A variety of such tolerance genes to the virus have been identified and, some have been successfully used in the  
35 breeding of commercial sugar beet varieties (29, 30, 31).



Only the use of BNYVV-resistant or tolerant varieties will enable farmers to grow sugar beet plants in BNYVV-infected areas where the sugar beet plant is an essential component of the crop rotation and contributes  
5 significantly to the grower's income.

A number of detailed studies have shown that a difference in susceptibility to the BNYVV-infection among sugar beet genotypes or varieties, generally reflect difference in the diffusion or translocation of the virus  
10 in the root tissues (32).

However, there are still few reports which indicate clearly that the tolerance genes, even from differing sources of sugar beet germplasm or wild relatives germplasm (33), would provide distinct mechanisms of  
15 resistance. Such a situation would represent a more manageable situation to design long lasting BNYVV-resistance strategies.

Since 1986, a number of reports and publications have described the use of isolated viral gene  
20 sequences expressed in plants to confer a high level of tolerance against the virus or even to confer a broad spectrum type of resistance against a number of related viruses (34, 35, 36). One of the most documented viral resistance strategy based on genetic engineering, in many  
25 cultivated species such as potato, squash, cucumber or tomato, is the use of the viral gene sequence which under the control of plant regulatory elements, encodes the coat-protein of the target virus (37).

However, for coat-protein mediated  
30 resistance, the expression of a certain level of resistance in the transgenic plant might be attributed to different mechanisms such as RNA co-suppression and not necessarily to the production of the protein sequence.

In general, the virus sequence will be  
35 transferred in an appropriate cell or tissue culture of the



plant species using an Agrobacterium mediated transformation system or a direct gene transfer method according to the constraints of the tissue culture or cell culture method which can be successfully applied in a given species. A whole plant will be regenerated and the expression of the transgene will be characterized.

Though sugar beet is known as a recalcitrant species in cell culture, limiting the extent of practical genetic engineering applications in that species, there are number of isolated reports of successful transformation and regeneration of whole plants (38). A few examples of engineering tolerance to the BNYVV by transforming and expressing the BNYVV coat-protein sequence in the sugar beet genome have also been published (39, WO91/13159) though they rarely report data on whole functional transgenic sugar beet plants (40). In particular, reports show limited data on the level of resistance observed in infected conditions with transgenic sugar beet plants transformed with a gene encoding a BNYVV coat-protein sequence (41, 42).

A complete technology package including a sugar beet transformation method and the use of the expression of the BNYVV coat-protein sequence as resistance source in the transgenic sugar beet plant obtained by said transformation method has been described in the Patent Application WO91/13159.

Based on the information published, it can not be concluded that the coat-protein mediated resistance mechanism provides any potential for conferring to the sugar beet plant a total immunity to the BNYVV-infection by inhibiting completely the virus multiplication and diffusion mechanisms. To identify a resistance mechanism which significantly blocks the spread of the virus at the early stage of the infection process would be a major step toward successfully developing such a transgenic





resistance. In addition, such resistance would diversify the mechanisms of resistance available.

Because the disease is shown to expand in many countries or areas, at a speed depending upon the combination of numerous local environmental and agricultural factors, there is a strong interest diversifying genetic resistance mechanisms which may, alone or in combination, confer a stable and long lasting resistance strategy in the current and future varieties of sugar beet plants which are grown for industrial use.

The genome of beet necrotic yellow vein benyvirus (BNYVV) consists of five plus-sense RNAs, two of which (RNAs 1 and 2) encode functions essential for infection of all plants while the other three (RNAs 3, 4 and 5) are implicated in vector-mediated infections of host plants (Beta macrocarpa, Beta vulgaris, Spinacear oleracea, Chenopodium quinoa, etc.) roots (1). Cell-to-cell movement of BNYVV is governed by a set of three successive, slightly overlapping viral genes on RNA 2 known as the triple gene block (TGB) (2), which encode the viral proteins P42, P13 and P15 (gene products are designated by their calculated  $M_r$  in kilodalton (3)).

In the following description, the TGB genes and the corresponding proteins will be identified by the following terms: TGB1, TGB2, TGB3 or by their encoded viral protein number P42, P13 and P15. TGB counterparts are present in other plant viruses and the characteristics of their TGB have allowed the classification of said viruses in two groups: the viruses of group I which include hordéiviruses, benyviruses, pecluviruses and pomoviruses and the viruses of group II represented by potexviruses and carlaviruses (4, 5, 6, 44).

For the viruses of group II, capsid protein is also involved in the cell-to-cell movement of viruses.



The development of a resistance to viral infections into a plant by blocking the cell-to-cell movement has been described for the potato viruses X (PVX) (45) and for the white clover mosaic virus (WC1MV) (46) in 5 Nicotiana benthamiana. These two viruses belong to the above-described group II. In both cases, various amino acids were replaced by Alanine in the hydrophilic part of the TGB sequence downstream of the N-terminal hydrophobic domain of said amino acid sequence. However, it was not 10 possible with said mutants to obtain total resistance, especially when a virus challenger concentration is increasing into the plant.

#### Aims of the invention

15 The present invention aims to provide a new method for introducing various viral resistances into a cell and a plant and the viral resistant cell and plant obtained.

A main aim of the invention is to provide a 20 new method for introducing BNYVV resistance into a cell and a plant and the BNYVV-resistant cell and plant, in particular a sugar beet cell and plant (Beta vulgaris ssp.), obtained.

#### 25 Summary of the invention

The present invention provides the use of an alternative sequence of plant virus, especially the BNYVV, to obtain a high degree of tolerance to the viral infection, in particular to ensure a rapid and total 30 blocking of virus multiplication and diffusion mechanisms in a plant, especially in the sugar beet plant (Beta vulgaris), including fodder beet, Swiss chard and table beet, which may also be subject to this viral infection. Expression of the resistance will be obtained in transgenic 35 cell and plant, especially sugar beet cells and plants



produced by the transformation method subject to the Patent Application WO95/10178 or by other transformation methods based on Agrobacterium tumefaciens or direct gene transfer. Because of its high efficiency, the transformation method  
5 as described in WO95/10178 enables the production of large numbers of transformed plants, especially sugar beet plants, and will be preferred to develop transgenic plants which may be analysed and characterized for their level of viral resistance, especially BNYVV Resistance, including  
10 their field evaluation.

In the table 1 are represented viruses having a TGB2 sequence, the molecular weight of TGB2 of said viruses, their host and references.



Table 1

Virus	Size of TGB2 (kDa)	Host	Reference
<b>GROUP I</b>			
Beet necrotic yellow vein virus	13	beet	Bouzouba et al., J. Gen. Virol. 67, 1689-1700 (1986)
Barley stripe mosaic virus	14	barley	Gustafson et al., Nucl. Acids Res. 14, 3895-3909 (1986)
Potato mop top virus	13	potato	Scott et al., J. Gen. Virol. 75, 3561-3568 (1994)
Peanut clump virus	14	peanut	Herzog et al., J. Gen. Virol. 75, 3147-3155 (1994)
Beet soil-borne virus	13	sugar beet	Koenig et al., Virology 216, 202-207 (1996)
<b>GROUP II</b>			
Apple stem pitting virus	13	apple	Jelkman, J. Gen. Virol. 75, 1535-1542 (1994)
Blueberry scorch virus	12	blue- berry	Cavileer et al., J. Gen. Virol. 75, 711-720 (1994)
Potato virus M	12	potato	Zavriev et al., J. Gen. Virol. 72, 9-14 (1991)
White clover mosaic virus	13	clover	Forster et al., Nucl. Acids Res. 16, 291-303 (1988)
Cymbidium mosaic virus	14	orchid	Neo et al., Plant Mol. Biol. 18, 1027-1029 (1992)

The Inventors propose herewith a new method for providing resistance to plant viruses into a plant by

5 blocking virus multiplication and diffusion mechanisms into said plant, especially into its root tissue. In order to demonstrate said resistance, the Inventors describe hereafter the effect of the overexpression of TGB2 sequence alone or in combination upon BNYVV multiplication and

10 diffusion mechanism in plants of C. quinoa which are also





the hosts of the BNYVV virus and which could be more easily manipulated by the man skilled in the art.

It is known that BNYVV does not require synthesis of viral coat protein for production of local  
5 lesions on leaves of hosts such as Chenopodium quinoa (7), indicating that virion formation is not required for cell-to-cell movement.

However, the manner in which the TGB components assist in the movement process is not understood  
10 although computer-assisted sequence comparisons have detected characteristic conserved sequences which may provide clues to their function. Thus, the 5'-proximal TGB protein (TGB1) invariably contains a series of sequence motifs characteristic of an ATP/GTP-binding helicase while  
15 the second protein (TGB2) always has two potentially membrane-spanning hydrophobic domains separated by a hydrophilic sequence which contains a highly conserved peptide motif of unknown significance (6).

So far, no example has been reported of a  
20 virus of group I in which the three TGB members are arranged differently on the same RNA or are parcelled out to different genome RNAs, suggesting that their association in a particular order might be important in regulating their function.

25 The present invention concerns a method for inducing viral resistance to a virus of group I comprising the triple gene block (TGB2). Said viruses of group I comprise hordéiviruses, benyviruses, pecluviruses and pomoviruses, preferably viruses selected from the group  
30 consisting of the beet necrotic yellow vein virus, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and the beet soil-borne virus; said method comprises the following steps:

- preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide  
35 sequence corresponding to at least 70% of the wild-type



nucleotide sequence of TGB2 of said group I virus or its corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant,

- transforming a plant cell with the nucleotide construct,  
5 and possibly
- regenerating the transgenic plant from the transformed plant cell.

Advantageously, the nucleotide sequence corresponding to at least 70% of the wild-type nucleotide  
10 sequence of TGB2 or its corresponding cDNA comprise the substitution of at least one amino acid into another different amino acid in the TGB2 wild-type sequence SEQ ID NO. 1 (Fig. 1). Preferably, the substitution of at least one amino acid into another different amino acid is made in  
15 regions rich in hydrophilic amino acids usually present at the surface of the corresponding protein in its native configuration. Preferably, a modification is made in the hydrophilic region of the wild-type sequence downstream the N-terminal hydrophobic domain and just upstream the  
20 conserved central domain.

According to a preferred embodiment of the present invention, said amino acids are each substituted by the amino acid Alanine.

Preferably, the plant or plant cell is a  
25 plant or plant cell which may be infected by the above-described virus and is preferably selected from the group consisting of potato, barley, peanut and sugar beet.

The present invention concerns also the obtained plant cell and transgenic (or transformed) plant  
30 (made of said plant cells) resistant to said viruses and comprising said nucleotide construct.

The Inventors have also discovered unexpectedly that it is possible to induce BNYVV-resistance into a plant by a method which comprises the following  
35 steps:



- preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide sequence corresponding to at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at least 90%, of the wild-type nucleotide sequence comprised between the nucleotides 5 3287 and 3643 of the 5' strand of the genomic or subgenomic wild-type RNA 2 of the BNYVV or its corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant,
- transforming a plant cell with said construct, and 10 possibly
- regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell.

The nucleotide sequence comprised between the nucleotides 3287 and 3643 of the 5' strand of the genomic 15 or subgenomic RNA 2 encoding the P13 protein is described in the Fig. 1 (SEQ ID NO. 1). A preferred mutated nucleotide sequence and its corresponding mutated amino acid sequence are described in the following specification as SEQ ID NO. 3 (Fig. 2).

20 Another aspect of the present invention concerns a plant cell and a transgenic plant (made of said plant cells) resistant to BNYVV and comprising a nucleotide construct having a nucleotide sequence corresponding to at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at 25 least 90%, of the nucleotide sequence comprised between the nucleotides 3287 and 3643 of the 5' strand of the genomic or subgenomic wild-type RNA 2 of BNYVV or its corresponding cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in the plant.

30 Preferably, said plant cell or transgenic plant (made of said plant cells) resistant to BNYVV is obtained by the method according to the invention.

The variants of the wild-type nucleotide sequence (SEQ ID NO. 1) comprise insertion, substitution or 35 deletion of nucleotides encoding the same or different



amino acid(s) (see Fig. 2). Therefore, the present invention concerns also said variants of the nucleotide sequence of SEQ ID NO. 1, for example SEQ ID NO. 3, which present at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at least 90%, homology with said nucleotide sequence and which are preferably able to hybridise to said nucleotide sequence in stringent or non-stringent conditions as described by Sambrook et al., §§ 9.47-9.51 in *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

A nucleotide sequence corresponding to at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at least 90%, of the nucleotide sequence comprised between the nucleotides 3287 and 3643 of the 5' strand of the genomic or subgenomic wild-type RNA 2 of BNYVV or its corresponding cDNA, is preferably a sequence comprising a substitution of at least one amino acid into another different amino acid in the wild-type RNA2 sequence of the BNYVV or its corresponding cDNA. Preferably said substitution is made in regions in which hydrophilic amino acids are usually present at the surface of the protein in its native configuration (47) as described in Fig. 2 (A = substitution by Alanine). Preferably, said substitution of one or more amino acids is a mutation which allows the substitution of one or more amino acids into one or more Alanine amino acids.

According to a preferred embodiment of the present invention, said nucleotide sequence is SEQ ID NO. 3.

Preferably, said sequences are also able to induce BNYVV resistance into a plant.

The terms "induce a viral resistance into a plant" mean inducing a possible reduction or a significant delay into the appearance of infection symptoms, virus





multiplication or its diffusion mechanisms into the plant, especially in the root tissues.

In Fig. 3 are represented results showing the capacity of a plant coinoculated with virus containing a replicon construct with the nucleotide sequence according to the invention, especially the sequence SEQ ID NO. 3, to inhibit the movement by BNYVV in C. Quinoa. The infectious factor of BNYVV is shown by the appearance of local lesions of leaves of said plant after co-inoculation of wild-type virus S12. Fig. 3 presents the number of local lesions upon leaves of a plant by a BNYVV S12 isolate (comprising RNA1 and RNA2) when co-inoculated with various replicons incorporating either mutated sequences including SEQ ID NO. 3 identified in Fig. 2 or a wild-type nucleotide sequence (T).

Eight days after said inoculation, the local lesions are identified. The results of three experiments show that the decreasing of said effect is mostly observed with the co-inoculation of the mutated sequence SEQ ID NO. 3 (up to 100% inhibition). This effect is not due to a possible blocking effect upon RNA1 and RNA2 replication, but the replicons according to the invention allow a blocking of the biochemical mechanisms involved in cell-to-cell movements by the infectious virus.

The regulatory sequence(s) of the nucleotide sequence according to the invention are promoter sequence(s) and terminator sequence(s) active into a plant.

The nucleotide construct may also include a selectable marker gene, which could be used to identify the transformed cell or plant and express the nucleotide construct according to the invention.

Preferably, the cell is a stomatal cell and the plant is a sugar beet (Beta vulgaris ssp.) made of said cells.



According to the invention, the promoter sequence is a constitutive or foreigner promoter sequence. Examples are 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter sequence, polyubiquitin Arabidopsis thaliana promoter (43),  
5 a promoter which is mainly active in root tissues such as the par promoter of the haemoglobin gene from Perosponia andersonii (Landsman et al., Mol. Gen. Genet. 214 : 68-73 (1988)) or a mixture thereof.

A last aspect of the present invention is  
10 related to a transgenic plant tissue such as fruit, stem, root, tuber, seed of the transgenic plant according to the invention or a reproducible structure (preferably selected from the group consisting of calluses, buds or embryos) obtained from the transgenic plant or the cell according to  
15 the invention.

The techniques of plant transformation, tissue culture and regeneration used in the method according to the invention are the ones well known by the person skilled in the art. Such techniques are preferably  
20 the ones described in the International Patent Applications WO95/10178 or WO91/13159 corresponding to the European Patent Application EP-B-0517833, which are incorporated herein by reference. These techniques are preferably used for the preparation of transgenic sugar beets according to  
25 the invention.



REFERENCES

1. Richards K.E. & Tamada T., *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, pp. 291-313 (1992)
2. Gilmer D. et al., *Virology* 189, pp. 40-47 (1992)
- 5 3. Bouzoubaa S. et al., *J. Gen. Virol.* 68, pp. 615-626 (1987)
4. Herzog E. et al., *J. Gen. Virol.* 18, pp. 3147-3155 (1994)
5. Scott K. P. et al., *J. Gen. Virol.* 75, pp. 3561-3568  
10 (1994)
6. Koonin E.V. & Dolja V.V., *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* 28, pp. 375-430 (1993)
7. Schmitt C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, pp. 5715-5719 (1992)
- 15 8. Morozov S.Y. et al., *J. Gen. Virol.* 72, pp. 2039-2042 (1991)
22. Pelletier J. & Sonenberg N, *Nature* 334, pp. 320-325 (1988)
23. Tamada T. & Baba T., *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 39, pp. 325-332 (1973)  
20
24. Kuszala M. & Putz C., *Annals of Phytopathology* 9, pp. 435-446 (1977)
25. Tamada T., *CMI/AAB Description of Plants Viruses* 44, (1975)
- 25 26. Asher M.J.C., *Rhizomania In The sugar beet crop*, ed. D.A. Cooke and R.K. Scott, Chapman & Hall, London, pp. 312-338 (1993)
27. Richard-Molard M., *Rhizomanie In Institut français de la betterave industrielle. Compte-rendu des travaux effectués en 1994*, ITB, Paris pp. 225-229 (1995)  
30
28. Henry C.M. et al, *Plant Pathology* 41, pp. 483-489 (1992)
29. Grassi G. et al., *Phytopath. Medit.* 28, pp. 131-139 (1989)



30. Merdinoglu D. et al., *Acad. Agric. Fr.* 79, n° 6, pp. 85-98 (1993)
31. Scolten O.E. et al., *Archives of Virology* 136, pp. 349-361 (1994)
- 5 32. Büttenr G. & Bürcky K., *Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Braunschweig Germany, August 21-24 (1990)
33. Whitney E.D., *Plant Disease* 73, pp. 287-289 (1989)
- 10 34. Powell A.P. et al., *Science* 232, pp. 738-743 (1986)
35. Fritchen J.H. & Beachy R.N., *Ann. Rev. Microbiol.* 47, pp. 739-763 (1993)
36. Wilson T.M.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, pp. 3134-3141 (1993)
- 15 37. Gonsalves D. & Slightom J.L., *Seminars in Virology* 4, pp. 397-405 (1993)
38. D'Halluin K. et al., *Biotechnology* 10, pp. 309-314 (1992)
39. Kallerhof J. et al., *Plant Cell Reports* 9, pp. 224-228 (1990)
- 20 40. Ehlers U. et al., *Theoretical and Applied Genetic* 81, pp. 777-782 (1991)
41. Kraus J. et al., *Field performance of transgenic sugar beet plants expressing BNYVV coat protein plants*, *Fourth International Congress of Plant Molecular Biology*, Int. Soc. for Plant Molecular Biology, Amsterdam (1994)
- 25 42. Maiss E. et al., *Proceedings of the Third International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*, Monterey, pp. 129-139 (1994)
- 30 43. Norris et al., *Plant Molecular Biology* 21, pp. 895-906 (1993)
44. Solovyev et al., *Virology* 219, pp. 9-18 (1996)





45. Seppänen P. et al., *J. of General Virology* 78, pp. 1241-1246 (1997)
46. Beck et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, pp. 10310-10314 (1994)
- 5 47. Cunningham et Wells, *Sciences* 244, pp. 1081-1085 (1989)



CLAIMS

1. Method for inducing resistance to a group I virus comprising a TGB2 sequence into a plant cell or a plant, comprising the following steps:

- 5 - preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide sequence corresponding to at least 70% of the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant,
- 10 - transforming a plant cell with the nucleotide construct, and possibly
- regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell.

2. Method according to the claim 1, characterized in that the nucleotide sequence of the nucleotide construct corresponds to at least 80%, preferably at least 90%, of the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA.

3. Method according to the claim 1 or 2, characterized in that the group I virus is selected from the group consisting of hordéiviruses, benyviruses, pecluviruses and pomoviruses, preferably selected from the group consisting of the beet necrotic yellow vein virus, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

4. Method according to any of the preceding claims, characterized in that the plant cell is a stomatal cell.

5. Method according to any of the preceding claims, characterized in that the plant is selected from the group consisting of sugar beet, potato, barley or peanut.

6. Method according to claim 1 or 2, characterized in that the virus is BNYVV, the nucleotide sequence of TGB2 of said virus is comprised between the



nucleotide 3287 and 3643 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of the BNYVV and the plant is a beet, preferably a sugar beet (*Beta vulgaris*).

7. Method according to any of the preceding  
5 claims, characterized in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence or a terminator sequence active in a plant.

8. Method according to claim 7 characterized  
in that the promoter sequence is a constitutive or a  
10 foreigner promoter sequence.

9. Method according to the preceding claim 7,  
characterized in that the promoter sequence is selected  
from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus  
promoter, and/or the polyubiquitin *Arabidopsis thaliana*  
15 promoter.

10. Method according to any of the claim 7 to  
9, characterized in that the promoter sequence is a  
promoter which is capable of being active mainly into the  
root tissues of plants, such as the par promoter of the  
20 haemoglobin gene from *Perosponia andersonii*.

11. Transgenic plant resistant to a group I  
virus comprising a nucleotide construct having a nucleotide  
sequence corresponding to at least 70% of the nucleotide  
sequence of TGB2 of said virus or its corresponding cDNA,  
25 being operably linked to one or more regulatory sequence(s)  
active in a plant.

12. Transgenic plant according to the claim  
11, characterized in that the nucleotide construct has a  
nucleotide sequence corresponding to at least 80%,  
30 preferably at least 90%, of the nucleotide sequence of TGB2  
of said virus or its complementary cDNA.

13. Transgenic plant according to the claim  
11 or 12, characterized in that the virus is selected from  
the group consisting of hordéiviruses, benyviruses,  
35 pecluviruses and pomoviruses, preferably selected from the



group consisting of the beet necrotic yellow vein virus, the barley stripe mosaic virus, the potato mop top virus, the peanut clump virus and the beet soil-borne virus.

14. Transgenic plant according to the claims  
5 11 to 13 being a plant selected from the group consisting of sugar beet, potato, barley or peanut.

15. Transgenic plant according to the claims  
11 or 12, characterized in that the transgenic plant being a beet, preferably a sugar beet (Beta vulgaris) the virus  
10 is BNYVV and the nucleotide sequence of TGB2 of said virus is comprised between the nucleotides 3287 and 3643 of the 5' strand of genomic or subgenomic RNA 2 of BNYVV or its corresponding cDNA.

16. Transgenic plant according to any of the  
15 preceding claims 11 to 15, characterized in that the regulatory sequence comprises a promoter sequence and a terminator sequence active in a plant.

17. Transgenic plant according to any of the  
preceding claims 11 to 16, characterized in that the  
20 regulatory sequence(s) comprise a promoter sequence which is a constitutive or a foreigner promoter sequence.

18. Transgenic plant according to the claim  
17, characterized in that promoter sequence is selected from the group consisting of 35S Cauliflower Mosaic Virus  
25 promoter, and/or the polyubiquitin Arabidopsis thaliana promoter.

19. Transgenic plant according to claim 17 or  
18 characterized in that the promoter sequence is a promoter which is capable of being active mainly into root  
30 tissues, such as the par promoter of the haemoglobin gene from Perosponia andersonii.

20. Transgenic plant tissue selected from the group consisting of fruit, stem, root, tuber, seed of a plant according to any of the preceding claims 11 to 19.





21. Transgenic plant according to any one of the claims 11 to 19, characterised in that it further carries natural tolerance to Group I viruses.

22. Transgenic plant according to any one of  
5 the claims 11 to 19 and 21, characterised in that it further comprises a pesticide, herbicide or fungicide resistance, preferably a resistance selected from the group consisting of nematode resistance, glyphosate resistance, glufosomate resistance and/or acetochloride resistance.

10



3287 ATGTCTAGGGAAATAACCGCTCGACCCAATAAGAATGTGCCTATTGTTGTTGGTGTGTTGT  
M S R E I T A R P N K N V P I V V G V C -  
3347 GTTGTGGCTTTCTTTGTATTGCTGGCGTTCATGCAGCAAAACATAAGACACATTCTGGG  
V V A F F V L L A F M Q Q K H K T H S G -  
3407 GGTGATTACCGAGTCCCAACATTTTCTAACGGTGGTATATATAGAGACGGTACAAGATCA  
G D Y G V P T F S N G G I Y R D G T R S -  
3467 GCTGATTTTAATAGTAACAATCATCGTGCCTTACGGGTGCGGTGGGCTCGGGGTAGCGTT  
A D F N S N N H R A Y G C G G S G G S V -  
3527 AGTAGTCGAGTTGGGCAGCAACTTATTGTGTTAGCTATTGTTTCTGTGTTAATAGTGTCA  
S S R V G Q Q L I V L A I V S V L I V S -  
3587 CTATTACAACGATTAAGGTCTCCACCAGAACACATTTGTAATGGTGCTTGTGGTTAA 3643  
L L Q R L R S P P E H I C N G A C G \*

FIG. 1

3287 ATGTCTAGGGAAATAACCGCTCGACCCAATAAGAATGTGCCTATTGTTGTTGGTGTGTTGT  
M S R E I T A R P N K N V P I V V G V C , -  
3347 GTTGTGGCTTTCTTTGTATTGCTGGCGTTCATGCAGCAAGCAGCTCGACACATTCTGGG  
V V A F F V L L A F M Q Q A A A T H S G -  
3407 GGTGATTACCGAGTCCCAACATTTTCTAACGGTGGTATATATAGAGACGGTACAAGATCA  
G D Y G V P T F S N G G I Y R D G T R S -  
3467 GCTGATTTTAATAGTAACAATCATCGTGCCTTACGGGTGCGGTGGGCTCGGGGTAGCGTT  
A D F N S N N H R A Y G C G G S G G S V -  
3527 AGTAGTCGAGTTGGGCAGCAACTTATTGTGTTAGCTATTGTTTCTGTGTTAATAGTGTCA  
S S R V G Q Q L I V L A I V S V L I V S -  
3587 CTATTACAACGATTAAGGTCTCCACCAGAACACATTTGTAATGGTGCTTGTGGTTAA 3643  
L L Q R L R S P P E H I C N G A C G \*

FIG. 2

518 Rec'd PCT/PTO 0 5 SEP 2001

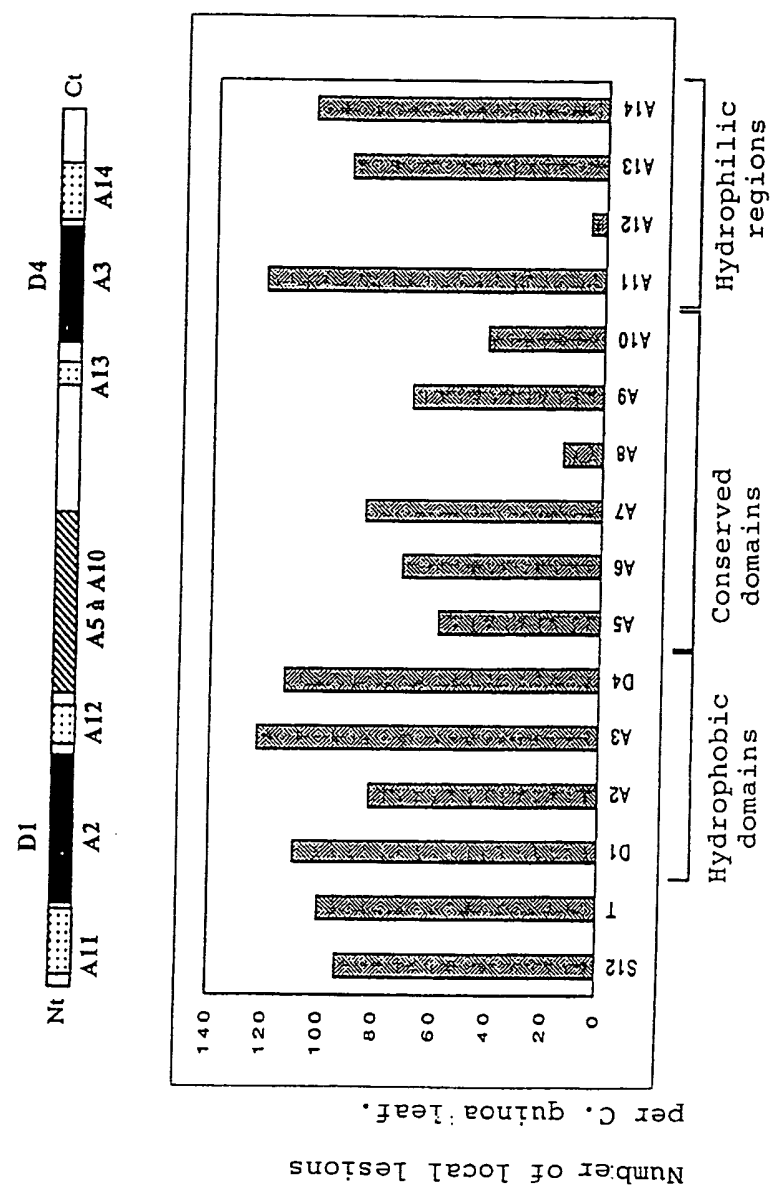


Fig. 3

518 Rec'd PCT/PTO 0 5 SEP 2001

<213> Beet necrotic yellow vein virus

<400> 2

Met Ser Arg Glu Ile Thr Ala Arg Pro Asn Lys Asn Val Pro Ile Val  
 1 5 10 15  
 Val Gly Val Cys Val Val Ala Phe Phe Val Leu Leu Ala Phe Met Gln  
 20 25 30  
 Gln Lys His Lys Thr His Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Val Pro Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Asn Gly Gly Ile Tyr Arg Asp Gly Thr Arg Ser Ala Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 Ser Asn Asn His Arg Ala Tyr Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Val  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Arg Val Gly Gln Gln Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Ser Val  
 85 90 95  
 Leu Ile Val Ser Leu Leu Gln Arg Leu Arg Ser Pro Pro Glu His Ile  
 100 105 110  
 Cys Asn Gly Ala Cys Gly  
 115

<210> 3

<211> 357

<212> DNA

<213> Beet necrotic yellow vein virus

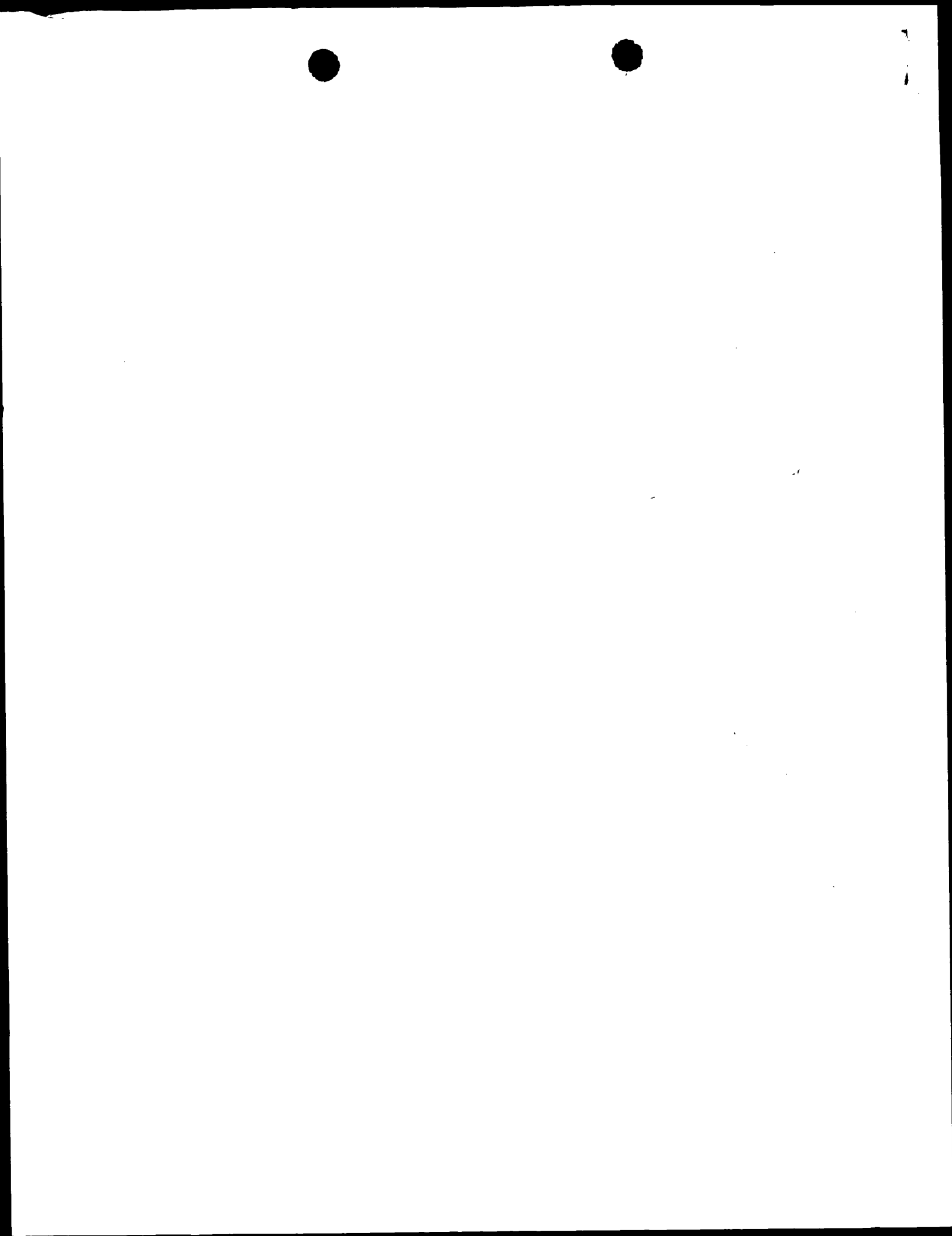
<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 3

atg tct agg gaa ata acc gct cga ccc aat aag aat gtg cct att gtt 48  
 Met Ser Arg Glu Ile Thr Ala Arg Pro Asn Lys Asn Val Pro Ile Val  
 1 5 10 15  
 gtt ggt gtt tgt gtt gtg gct ttc ttt gta ttg ctg gcg ttc atg cag 96  
 Val Gly Val Cys Val Val Ala Phe Phe Val Leu Leu Ala Phe Met Gln  
 20 25 30  
 caa gca gct gcg aca cat tct ggg ggt gat tac gga gtc cca aca ttt 144  
 Gln Ala Ala Ala Thr His Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Val Pro Thr Phe  
 35 40 45  
 tct aac ggt ggt ata tat aga gac ggt aca aga tca gct gat ttt aat 192  
 Ser Asn Gly Gly Ile Tyr Arg Asp Gly Thr Arg Ser Ala Asp Phe Asn  
 50 55 60  
 agt aac aat cat cgt gct tac ggg tgc ggt ggg tct ggg ggt agc gtt 240  
 Ser Asn Asn His Arg Ala Tyr Gly Cys Gly Ser Gly Gly Ser Val  
 65 70 75 80  
 agt agt cga gtt ggg cag caa ctt att gtg tta gct att gtt tct gtg 288  
 Ser Ser Arg Val Gly Gln Gln Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Ser Val





WO 00/55301

PCT/EP00/02176

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> METHOD FOR INDUCING VIRAL RESISTANCE INTO A PLANT

<130> P.SES.03/EP

<140> 99200773.2

<141> 1999-03-12

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> Beet necrotic yellow vein virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 1

atg tct agg gaa ata acc gct cga ccc aat aag aat gtg cct att gtt	48
Met Ser Arg Glu Ile Thr Ala Arg Pro Asn Lys Asn Val Pro Ile Val	
1 5 10 15	

gtt ggt gtt tgt gtt gtg gct ttc ttt gta ttg ctg gcg ttc atg cag	96
Val Gly Val Cys Val Val Ala Phe Phe Val Leu Leu Ala Phe Met Gln	
20 25 30	

caa aaa cat aag aca cat tct ggg ggt gat tac gga gtc cca aca ttt	144
Gln Lys His Lys Thr His Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Val Pro Thr Phe	
35 40 45	

tct aac ggt ggt ata tat aga gac ggt aca aga tca gct gat ttt aat	192
Ser Asn Gly Gly Ile Tyr Arg Asp Gly Thr Arg Ser Ala Asp Phe Asn	
50 55 60	

agt aac aat cat cgt gct tac ggg tgc ggt ggg tct ggg ggt agc gtt	240
Ser Asn Asn His Arg Ala Tyr Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Val	
65 70 75 80	

agt agt cga gtt ggg cag caa ctt att gtg tta gct att gtt tct gtg	288
Ser Ser Arg Val Gly Gln Gln Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Ser Val	
85 90 95	

tta ata gtg tca cta tta caa cga tta agg tct cca cca gaa cac att	336
Leu Ile Val Ser Leu Leu Gln Arg Leu Arg Ser Pro Pro Glu His Ile	
100 105 110	

tgt aat ggt gct tgt ggt taa	357
Cys Asn Gly Ala Cys Gly	
115	

<210> 2

<211> 118

<212> PRT



	85	90	95	
tta ata gtg tca cta tta caa cga tta agg tct cca cca gaa cac att				336
Leu Ile Val Ser Leu Leu Gln Arg Leu Arg Ser Pro Pro Glu His Ile				
	100	105	110	

tgt aat ggt gct tgt ggt taa				357
Cys Asn Gly Ala Cys Gly				
	115			

<210> 4  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Beet necrotic yellow vein virus

<400> 4  
 Met Ser Arg Glu Ile Thr Ala Arg Pro Asn Lys Asn Val Pro Ile Val  
     1                    5                    10                    15  
 Val Gly Val Cys Val Val Ala Phe Phe Val Leu Leu Ala Phe Met Gln  
                     20                    25                    30  
 Gln Ala Ala Ala Thr His Ser Gly Gly Asp Tyr Gly Val Pro Thr Phe  
                     35                    40                    45  
 Ser Asn Gly Gly Ile Tyr Arg Asp Gly Thr Arg Ser Ala Asp Phe Asn  
                     50                    55                    60  
 Ser Asn Asn His Arg Ala Tyr Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Val  
                     65                    70                    75                    80  
 Ser Ser Arg Val Gly Gln Gln Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Ser Val  
                     85                    90                    95  
 Leu Ile Val Ser Leu Leu Gln Arg Leu Arg Ser Pro Pro Glu His Ile  
                     100                    105                    110  
 Cys Asn Gly Ala Cys Gly  
                     115



1

1

1

1

1

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 10 November 2000 (10.11.00)	
International application No. PCT/EP00/02176	Applicant's or agent's file reference P.SES.03/WO
International filing date (day/month/year) 07 March 2000 (07.03.00)	Priority date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)
Applicant JONARD, Gérard et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

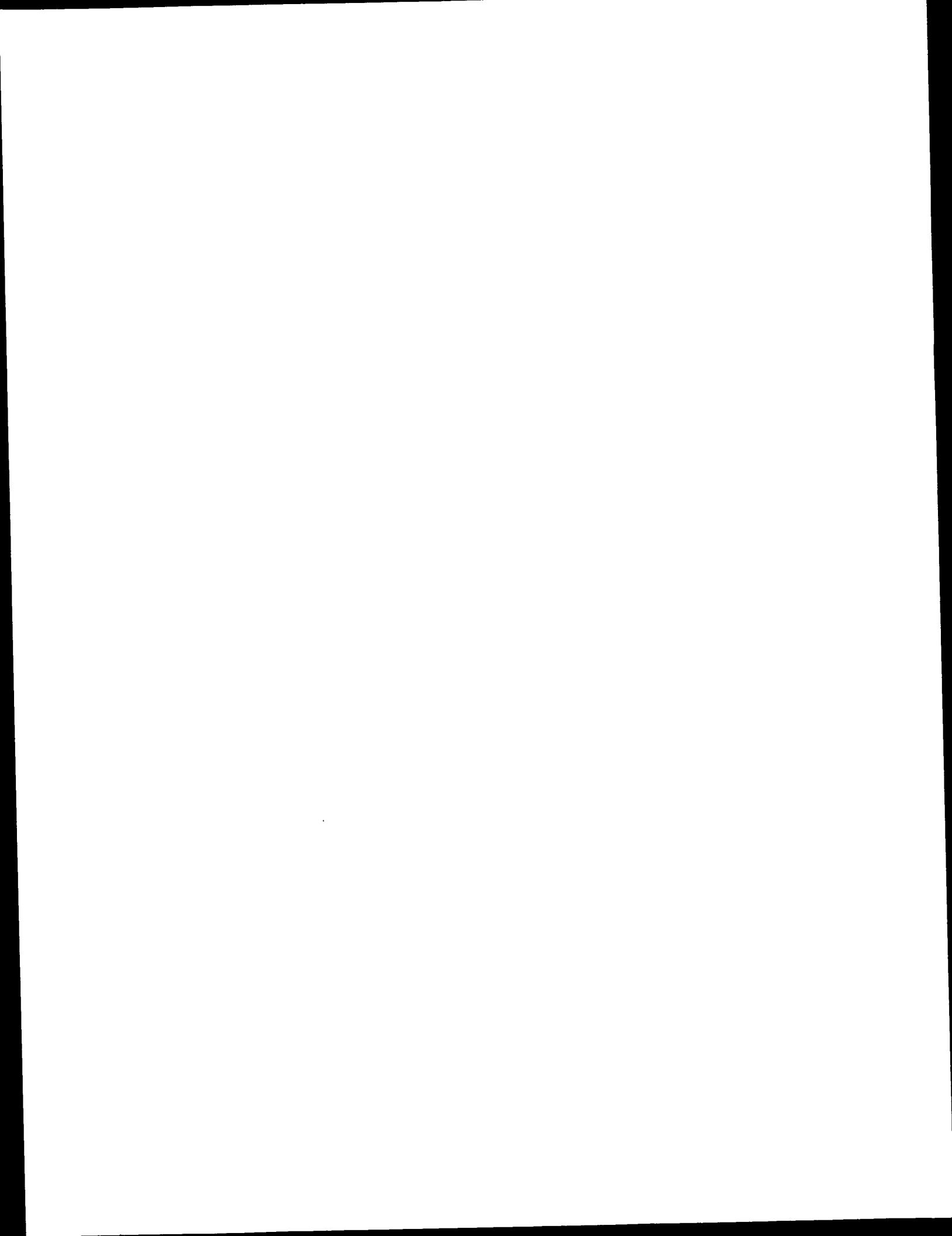
☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
09 September 2000 (09.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Zakaria EL KHODARY
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
21 September 2000 (21.09.2000)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 00/55301 A3

(51) International Patent Classification?: C12N 15/40,  
15/82, A01H 5/00

(21) International Application Number: PCT/EP00/02176

(22) International Filing Date: 7 March 2000 (07.03.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
99200773.2 12 March 1999 (12.03.1999) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): CENTRE  
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
(CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
Cedex 16 (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): JONARD, Gérard  
[FR/FR]; 12, rue du Général Zimmer, F-67084 Strasbourg

Cedex (FR). LAUBER, Emmanuelle [FR/FR]; 34, rue  
de Rotterdam, F-67000 Strasbourg (FR). GUILLEY,  
Hubert [FR/FR]; 32, rue de l'Herbe, F-67370 Berstett  
(FR). RICHARDS, Kenneth [FR/FR]; 2a, rue Principale,  
F-67570 Pfulgriesheim (FR).

(74) Agents: VAN MALDEREN, Joëlle et al.; Office Van  
Malderen, 6/1, place Reine Fabiola, B-1083 Brussels (BE).

(81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR INDUCING VIRAL RESISTANCE INTO A PLANT

3287 ATGICTAGGGAAATAACCGCTCGACCCAATAAGAATGTGCTTATTGTTGTTGGTGGTGGT  
M S R E I T A R P N K N V P I V V G V C -

3347 GTTGTGGCTTTCTTTGTATTGCTGGCGTTTCATGCAGCAAAAACATAAGACACATTCTGGG  
V V A F F V L L A F M Q Q K H K T H S G -

3407 GGTGATTACGGAGTCCCAACATTTCTAACGGTGGTATATATAGAGACGGTACAAGATCA  
G D Y G V P T F S N G G I Y R D G T R S -

3467 GCTGATTTTAAATAGTAACAATCATCGTGGCTTACGGGTGGGTGGGTCTGGGGGTAGCGTT  
A D F N S N N H R A Y G C G G S G G S V -

3527 AGTAGTCAGATTGGGCAGCAACTTATTGTGTAGCTATTGTTTCTGTTGTTAATAGTGCA  
S S R V G Q Q L I V L A I V S V L I V S -

3587 CTATTACAACGATTAAAGGCTCCACCAGAACACATTGTGTAATGGTGCTTGTGGTTAA 3643  
L L Q R L R S P P E H I C N G A C G \*

(57) Abstract: The present invention concerns a method for inducing resistance to a virus comprising a TGB2 sequence into a cell plant or a plant, comprising the following steps: preparing a nucleotide construct comprising a nucleotide sequence corresponding to at least 70 % of the nucleotide sequence of TGB2 of said virus or its complementary cDNA, being operably linked to one or more regulatory sequence(s) active in a plant, transforming a plant cell with the nucleotide construct, and possibly regenerating a transgenic plant from the transformed plant cell. The present invention is also related to the plant obtained.

WO 00/55301 A3

